

(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-222058

(43)公開日 平成6年(1994)8月12日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/531	A	8310-2 J		
C 0 7 K 3/08		8318-4H		
15/12		8318-4H		
17/00		8318-4H		
G 0 1 N 33/532	Z	8310-2 J		

審査請求 有 請求項の数142 F D (全 37 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平4-225325  
実願平1-600025の変更  
(22)出願日 昭和63年(1988)9月30日  
(31)優先権主張番号 1 0 3, 0 9 3  
(32)優先日 1987年9月30日  
(33)優先権主張国 米国 (U S)

(71)出願人 591028256  
ベックマン インストルメンツ インコー  
ポレーテッド  
BECKMAN INSTRUMENT  
S, INCORPORATED  
アメリカ合衆国 92634 カリフォルニア  
州 フラートン ハーバー ボルバード  
2500  
(72)発明者 チャン エス オー  
アメリカ合衆国 91765 カリフォルニア  
州 ダイヤモンド パー ワゴン トレイ  
ル ロード 23323  
(74)代理人 弁理士 松永 宣行

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 三座共役体、その製造方法及びその使用方法

(57)【要約】

【目的】 ハプテン、薬剤等を簡便に検定することができ、化学的に安定な共役体、その製造方法及びそれを用いた免疫検定方法を提供する。

【構成】 互いに適切なスペーサー基を通じて結合した、少なくとも2つは巨大分子と相互作用することができる低分子である三座体メンバーを持つ三座共役体、その製造方法及びその使用方法。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 適当なスペーサー基を通じて互いに結合した 3 つの三座体メンバーを有し、該三座体メンバーの少なくとも 2 つが低分子である三座共役体。

【請求項 2】 該三座体メンバーの少なくとも 1 つが低分子配位子である請求項 1 記載の三座共役体。

【請求項 3】 該スペーサー基が巨大分子特異結合パートナーの低分子配位子メンバーに対する結合が異なった巨大分子の少なくとも 1 つの他の三座メンバーとの結合を立体的に阻害するように選択される請求項 2 記載の三座共役体。

【請求項 4】 該低分子配位子メンバーが関心とする被検出体と同一又は類似である請求項 3 記載の三座共役体。

【請求項 5】 該関心とする被検出体がハブテン、ホルモン、ポリペプチド、オリゴヌクレオチド及びビタミンからなる群から選ばれる請求項 4 記載の三座共役体。

【請求項 6】 該被検出体が約 1 0 0 及び 1 5 0 0 ダルトンの間の分子量を有するハブテンである請求項 5 記載の三座共役体。

【請求項 7】 第 1 三座体メンバー及び第 2 三座体メンバーが同じ巨大分子と結合可能である請求項 1 記載の三座共役体。

【請求項 8】 該第 1 三座体メンバーが該巨大分子上の 1 つ又は複数の位置を探索し結合することができる請求項 7 記載の三座共役体。

【請求項 9】 該第 2 三座体メンバーが該第 1 三座体メンバーが結合する該位置の近接部で該巨大分子と永久結合できるものである請求項 8 記載の三座共役体。

【請求項 1 0】 第 3 三座体メンバーが標識、トレーサー、リポーター基、固体支持体からなる群から選ばれる請求項 9 記載の三座共役体。

【請求項 1 1】 該第 1 三座体メンバーが化学的活性基である請求項 1 0 記載の三座共役体。

【請求項 1 2】 該第 1 三座体メンバーがフェニルボロン酸である請求項 1 1 記載の三座共役体。

【請求項 1 3】 該第 1 三座体メンバーが低分子配位子である請求項 1 0 記載の三座共役体。

【請求項 1 4】 該第 2 三座体メンバーが化学的活性基である請求項 1 0 記載の三座共役体。

【請求項 1 5】 該第 2 三座体メンバーがアジド残基である請求項 1 4 記載の三座共役体。

【請求項 1 6】 該第 1 及び第 2 三座体メンバーが化学的活性基である請求項 1 4 記載の三座共役体。

【請求項 1 7】 該第 1 三座体メンバーがフェニルボロン酸であり、該第 2 三座体メンバーがアジド残基である請求項 1 6 記載の三座共役体。

【請求項 1 8】 該第 3 三座体メンバーがアガビオチンである請求項 1 7 記載の三座共役体。

【請求項 1 9】 該第 1 三座体メンバーが低分子配位子

であり、該第 2 三座体メンバーが化学的活性基である請求項 1 4 記載の三座共役体。

【請求項 2 0】 該第 1 三座体メンバーが低分子配位子であり、該第 2 三座体メンバーがアジド残基である請求項 1 9 記載の三座共役体。

【請求項 2 1】 該三座体メンバーの少なくとも 2 つが低分子配位子である請求項 1 記載の三座共役体。

【請求項 2 2】 該スペーサー基が第 1 巨大分子特異結合パートナーの第 1 低分子配位子メンバーに対する結合が第 2 巨大分子特異結合パートナーの第 2 低分子配位子メンバーとの結合によって立体的に阻害されるように選択される請求項 2 1 記載の三座共役体。

【請求項 2 3】 該第 2 低分子配位子メンバーが関心の被検出体と同一又は類似である請求項 2 2 記載の三座共役体。

【請求項 2 4】 該関心とする被検出体がハブテン、ホルモン、ポリペプチド、オリゴヌクレオチド及びビタミンからなる群から選ばれる請求項 2 3 記載の三座共役体。

【請求項 2 5】 該被検出体が約 1 0 0 及び 1 5 0 0 ダルトンの間の分子量を有するハブテンである請求項 2 4 記載の三座共役体。

【請求項 2 6】 該被検出体がテオフィリン、テオフィリンアミン、ジゴキシン、ジシラミド、ライドカイン、プロカインアミド、プロパノール、キニジン、アミカマイシン、クロラムフェニコール、ゲンタマイシン、カナマイシン、ネチルマイシン、トブラマイシン、三環抗うつ剤、エソスクシミド、フェノバルビタール、フェントイン、プリミドン、バルプロイン酸、アセトミノフェン、アセチルサリチル酸、メソトレキセート、及びモルフィネ、コデイン、ヘロインなどの悪習薬並びにそれらの代謝生成物、DNP、1-置換-4-ヒドロキシ-2-ニトロベンゼン及び4-置換-2-ニトロトリアルキルアニリニウム塩からなる群から選ばれる請求項 2 5 記載の三座共役体。

【請求項 2 7】 該被検出体がテオフィリン及びテオフィリンアミンからなる群から選ばれる請求項 2 6 記載の三座共役体。

【請求項 2 8】 該第 1 低分子配位子がビオチン及びDNPからなる群から選ばれる請求項 2 7 記載の三座共役体。

【請求項 2 9】 該第 1 巨大分子特異結合パートナーが第 1 接近標識に複合している請求項 2 3 記載の三座共役体。

【請求項 3 0】 該関心とする被検出体がハブテン、ホルモン、ポリペプチド、オリゴヌクレオチド及びビタミンからなる群から選ばれる請求項 2 9 記載の三座共役体。

【請求項 3 1】 該被検出体が約 1 0 0 及び 1 5 0 0 ダルトンの間の分子量を有するハブテンである請求項 3 0

記載の三座共役体。

【請求項 3 2】 該被検出体がテオフィリン、テオフィリン-アミン、ジゴキシン、ジソピラミド、ライドカイン、プロカインアミド、プロパノロール、キニジン、アミカマイシン、クロラムフェニコール、ゲンタマイシン、カナマイシン、ネチルマイシン、トブラマイシン、三環抗うつ剤、エソスクシミド、フェノバルビタール、フェニトイン、プリミドン、バルプロイン酸、アセトミノフェン、アセチルサリチル酸、メソトレキセート、及びモルフィネ、コデイン、ヘロインなどの悪習薬並びにそれらの代謝生成物、DNP、1-置換-4-ヒドロキシ-2-ニトロベンゼン及び4-置換-2-ニトロトリアルキルアニリニウム塩からなる群から選ばれる請求項 3 1 記載の三座共役体。

【請求項 3 3】 該被検出体がテオフィリン及びテオフィリン-アミンからなる群から選ばれる請求項 3 2 記載の三座共役体。

【請求項 3 4】 該第 1 低分子配位子がビオチン及び DNP からなる群から選ばれる請求項 3 3 記載の三座共役体。

【請求項 3 5】 該三座体メンバーの 1 つが第 2 接近標識である請求項 2 9 記載の三座共役体。

【請求項 3 6】 該関心とする被検出体がハブテン、ホルモン、ポリペプチド、オリゴヌクレオチド及びビタミンからなる群から選ばれる請求項 3 5 記載の三座共役体。

【請求項 3 7】 該被検出体が約 100 及び 1500 ダルトンの間の分子量を有するハブテンである請求項 3 6 記載の三座共役体。

【請求項 3 8】 該被検出体がテオフィリン、テオフィリン-アミン、ジゴキシン、ジソピラミド、ライドカイン、プロカインアミド、プロパノロール、キニジン、アミカマイシン、クロラムフェニコール、ゲンタマイシン、カナマイシン、ネチルマイシン、トブラマイシン、三環抗うつ剤、エソスクシミド、フェノバルビタール、フェニトイン、プリミドン、バルプロイン酸、アセトミノフェン、アセチルサリチル酸、メソトレキセート、及びモルフィネ、コデイン、ヘロインなどの悪習薬並びにそれらの代謝生成物、DNP、1-置換-4-ヒドロキシ-2-ニトロベンゼン及び4-置換-2-ニトロトリアルキルアニリニウム塩からなる群から選ばれる請求項 3 7 記載の三座共役体。

【請求項 3 9】 該被検出体がテオフィリン及びテオフィリン-アミンからなる群から選ばれる請求項 3 8 記載の三座共役体。

【請求項 4 0】 該第 1 低分子配位子がビオチン及び DNP からなる群から選ばれる請求項 3 9 記載の三座共役体。

【請求項 4 1】 該三座体メンバーの 1 つが複数の第 2 接近標識と共役された巨大分子である請求項 2 9 記載の

三座共役体。

【請求項 4 2】 該関心とする被検出体がハブテン、ホルモン、ポリペプチド、オリゴヌクレオチド及びビタミンからなる群から選ばれる請求項 4 1 記載の三座共役体。

【請求項 4 3】 該被検出体が約 100 及び 1500 ダルトンの間の分子量を有するハブテンである請求項 4 2 記載の三座共役体。

【請求項 4 4】 該被検出体がテオフィリン、テオフィリン-アミン、ジゴキシン、ジソピラミド、ライドカイン、プロカインアミド、プロパノロール、キニジン、アミカマイシン、クロラムフェニコール、ゲンタマイシン、カナマイシン、ネチルマイシン、トブラマイシン、三環抗うつ剤、エソスクシミド、フェノバルビタール、フェニトイン、プリミドン、バルプロイン酸、アセトミノフェン、アセチルサリチル酸、メソトレキセート、及びモルフィネ、コデイン、ヘロインなどの悪習薬並びにそれらの代謝生成物、DNP、1-置換-4-ヒドロキシ-2-ニトロベンゼン及び4-置換-2-ニトロトリアルキルアニリニウム塩からなる群から選ばれる請求項 4 3 記載の三座共役体。

【請求項 4 5】 該被検出体がテオフィリン及びテオフィリン-アミンからなる群から選ばれる請求項 4 4 記載の三座共役体。

【請求項 4 6】 該第 1 低分子配位子がビオチン及び DNP からなる群から選ばれる請求項 4 5 記載の三座共役体。

【請求項 4 7】 該第 1 及び第 2 接近標識がエネルギー供与体及びエネルギー受容体からなる群から選ばれる請求項 3 5 記載の三座共役体。

【請求項 4 8】 該エネルギー供与体が蛍光化合物、シンチレーション染料及び化学発光化合物からなる群から選ばれる請求項 4 7 記載の三座共役体。

【請求項 4 9】 該エネルギー受容体がフルオレセイン、ローダミン、蛍光ランタニドキレート剤及びプロトポルフィリンの蛍光性スズ又は亜鉛誘導体からなる群から選ばれる請求項 4 7 記載の三座共役体。

【請求項 5 0】 該エネルギー供与体がイソルミノールである請求項 4 8 記載の三座共役体。

【請求項 5 1】 該エネルギー供与体がアクリジンエステルである請求項 4 8 記載の三座共役体。

【請求項 5 2】 該エネルギー受容体がフルオレセインである請求項 4 9 記載の三座共役体。

【請求項 5 3】 該エネルギー受容体がローダミンである請求項 4 9 記載の三座共役体。

【請求項 5 4】 該エネルギー供与体がイソルミナールであり、かつ該エネルギー受容体がフルオレセンである請求項 5 2 記載の三座共役体。

【請求項 5 5】 該エネルギー供与体がアクリジンエステルであり、かつ該エネルギー受容体がフルオレセインで

ある請求項 5 2 記載の三座共役体。

【請求項 5 6】 該エネルギー供与体がフルオレsein であり、該エネルギー受容体がローダミンである請求項 5 3 記載の三座共役体。

【請求項 5 7】 該第 1 及び第 2 接近標識が酵素である請求項 3 5 記載の三座共役体。

【請求項 5 8】 該酵素がグルコースオキシダーゼ及びペルオキシダーゼからなる群から選ばれる請求項 5 7 記載の三座共役体。

【請求項 5 9】 該第 1 及び第 2 酵素がヘキソナーゼ及びグルコース-6-リン酸塩デヒドロキシナーゼからなる群から選ばれる請求項 5 7 記載の三座共役体。

【請求項 6 0】 該第 1 及び第 2 接近標識がエネルギー供与体及びエネルギー受容体からなる群から選ばれる請求項 4 1 記載の三座共役体。

【請求項 6 1】 該エネルギー供与体が蛍光化合物、シンチレーション染料及び化学発光化合物からなる群から選ばれる請求項 6 0 記載の三座共役体。

【請求項 6 2】 該エネルギー受容体がフルオレsein、ローダミン、蛍光ランタニドキレート及びプロトポルフィリンの蛍光スズ及び亜鉛誘導体からなる群から選ばれる請求項 6 0 記載の三座共役体。

【請求項 6 3】 該エネルギー供与体がイソルミノールである請求項 6 1 記載の三座共役体。

【請求項 6 4】 該エネルギー供与体がアクリジニエステルである請求項 6 1 記載の三座共役体。

【請求項 6 5】 該エネルギー受容体がフルオレsein である請求項 6 2 記載の三座共役体。

【請求項 6 6】 該エネルギー受容体がローダミンである請求項 6 2 記載の三座共役体。

【請求項 6 7】 該エネルギー供与体がイソルミナルであり、かつ該エネルギー受容体がフルオレsein である請求項 6 5 記載の三座共役体。

【請求項 6 8】 該エネルギー供与体がアクリジニエステルであり、かつ該エネルギー受容体がフルオレsein である請求項 6 5 記載の三座共役体。

【請求項 6 9】 該エネルギー供与体がフルオレsein であり、該エネルギー受容体がローダミンである請求項 6 6 記載の三座共役体。

【請求項 7 0】 該第 1 及び第 2 接近標識が酵素である請求項 4 1 記載の三座共役体。

【請求項 7 1】 該酵素がグルコースオキシダーゼ及びペルオキシダーゼからなる群から選ばれる請求項 7 0 記載の三座共役体。

【請求項 7 2】 該第 1 及び第 2 酵素がヘキソナーゼ及びグルコース-6-リン酸塩デヒドロキシナーゼからなる群から選ばれる請求項 7 0 記載の三座共役体。

【請求項 7 3】 第 1 三座体メンバーおよび第 2 三座体メンバーが同じ巨大分子と結合可能である請求項 2 1 記載の三座共役体。

【請求項 7 4】 該第 1 三座体メンバーが該巨大分子上の 1 つ又は複数の位置を探索し結合することができる請求項 7 3 記載の三座共役体。

【請求項 7 5】 該第 2 三座体メンバーが該第 1 三座体メンバーが結合する該位置の近接部で該巨大分子と永久結合できるものである請求項 7 4 記載の三座共役体。

【請求項 7 6】 第 3 三座体メンバーが標識、トレーサー、リポーター基、固体支持体からなる群から選ばれる請求項 7 5 記載の三座共役体。

【請求項 7 7】 該第 1 三座体メンバーが低分子配位子であり、該第 2 三座体メンバーが化学的活性基である請求項 7 6 記載の三座共役体。

【請求項 7 8】 該第 1 三座体メンバーが低分子配位子であり、該第 2 三座体メンバーがアジド残基である請求項 7 7 記載の三座共役体。

【請求項 7 9】 該三座体メンバーのすべての 3 つが低分子配位子である請求項 1 記載の三座共役体。

【請求項 8 0】 該スパーサー基が第 1 巨大分子特異結合パートナーの第 1 低分子配位子メンバーに対する結合が第 2 巨大分子特異結合パートナーの第 2 低分子配位子メンバーとの結合によって立体的に阻害されるように選択される請求項 7 9 記載の三座共役体。

【請求項 8 1】 該第 2 低分子配位子メンバーが関心とする被検出体と同一又は類似である請求項 8 0 記載の三座共役体。

【請求項 8 2】 該関心とする被検出体がハプテン、ホルモン、ポリペプチド、オリゴスクレオチド及びビタミンからなる群から選ばれる請求項 8 1 記載の三座共役体。

【請求項 8 3】 該被検出体が約 1 0 0 及び 1 5 0 0 ダルトンの間の分子量を有するハプテンである請求項 8 2 記載の三座共役体。

【請求項 8 4】 該被検出体がテオフィリン、テオフィリン-アミン、ジゴキシン、ジソピラミド、ライドカイン、プロカインアミド、プロパノール、キニジン、アミカマイシン、クロラムフェニコール、ゲンタマイシン、カナマイシン、ネチルマイシン、トブラマイシン、三環抗うつ剤、エソスクシミド、フェノバルビタール、フェニトイン、プリミドン、バルプロイン酸、アセトミノフェン、アセチルサリチル酸、メソトレキセート、及びモルフィネ、コデイン、ヘロインなどの悪習薬並びにそれらの代謝生成物、DNP、1-置換-4-ヒドロキシ-2-ニトロベンゼン及び4-置換-2-ニトロトリアルキルアニリニウム塩からなる群から選ばれる請求項 8 3 記載の三座共役体。

【請求項 8 5】 該被検出体がテオフィリン及びテオフィリン-アミンからなる群から選ばれる請求項 8 4 記載の三座共役体。

【請求項 8 6】 該第 1 低分子配位子がビオチン及びDNPからなる群から選ばれる請求項 8 5 記載の三座共役

体。

【請求項 87】 第3高分子特異結合パートナーが第3低分子配位子メンバーと特異結合し得るものである請求項 80 記載の三座共役体。

【請求項 88】 該第1高分子特異結合パートナー及び該第3巨大分子特異結合パートナーが多価である請求項 87 記載の三座共役体。

【請求項 89】 該第2低分子配位子メンバーが関心の被検出体と同一又は類似である請求項 88 記載の三座共役体。

【請求項 90】 該関心とする被検出体がハブテン、ホルモン、ポリペプチド、オリゴヌクレオチド及びビタミンからなる群から選ばれる請求項 89 記載の三座共役体。

【請求項 91】 該被検出体が約 100 及び 1500 ダルトンの間の分子量を有するハブテンである請求項 90 記載の三座共役体。

【請求項 92】 該被検出体がテオフィリン、テオフィリンアミン、ジゴキシン、ジソピラミド、ライドカイン、プロカインアミド、プロパノロール、キニジン、アミカマイシン、クロラムフェニコール、ゲンタマイシン、カナマイシン、ネチルマイシン、トブラマイシン、三環抗うつ剤、エソスクシミド、フェノバルビタール、フェニトイン、プリミドン、バルプロイン酸、アセトミノフェン、アセチルサリチル酸、メソトレキセート、及びモルフィネ、コデイン、ヘロインなどの悪習薬並びにそれらの代謝生成物、DNP、1-置換-4-ヒドロキシ-2-ニトロベンゼン及び4-置換-2-ニトロトリアルキルアニリニウム塩からなる群から選ばれる請求項 91 記載の三座共役体。

【請求項 93】 該被検出体がテオフィリン及びテオフィリンアミンからなる群から選ばれる請求項 92 記載の三座共役体。

【請求項 94】 該第1及び第3低分子配位子がビオチン及びDNPからなる群から選ばれる請求項 93 記載の三座共役体。

【請求項 95】 該第1巨大分子特異結合パートナーが第1接近標識と複合化し、該第2巨大分子特異結合パートナーが第2接近標識と複合化している請求項 87 記載の三座共役体。

【請求項 96】 該第1及び第2接近標識がエネルギー供与体及びエネルギー受容体からなる群から選ばれる請求項 95 記載の三座共役体。

【請求項 97】 該エネルギー供与体が蛍光化合物、シンチレーション染料及び化学発光化合物からなる群から選ばれる請求項 96 記載の三座共役体。

【請求項 98】 該エネルギー受容体がフルオレsein、ローダミン、蛍光ランタニド・キレート剤及びフォトポリフィリンの蛍光スズ及び亜鉛誘導体からなる群から選ばれる請求項 96 記載の三座共役体。

【請求項 99】 該エネルギー供与体がイソルミノールである請求項 97 記載の三座共役体。

【請求項 100】 該エネルギー供与体がアクリジニエステルである請求項 97 記載の三座共役体。

【請求項 101】 該エネルギー受容体がフルオレseinである請求項 98 記載の三座共役体。

【請求項 102】 該エネルギー受容体がローダミンである請求項 98 記載の三座共役体。

【請求項 103】 該エネルギー供与体がイソルミノールであり、該エネルギー受容体がフルオレseinである請求項 101 記載の三座共役体。

【請求項 104】 該エネルギー供与体がアクリジニエステルであり、該エネルギー受容体がフルオレseinである請求項 101 記載の三座共役体。

【請求項 105】 該エネルギー供与体がフルオレseinであり、該エネルギー受容体がローダミンである請求項 102 記載の三座共役体。

【請求項 106】 該第1及び第2接近標識が酵素である請求項 95 記載の三座共役体。

【請求項 107】 該酵素がグルコースオキシダーゼ及びペルオキシダーゼからなる群から選ばれる請求項 106 記載の三座共役体。

【請求項 108】 該酵素がヘキソキナーゼ及びグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼからなる群から選ばれる請求項 106 記載の三座共役体。

【請求項 109】 (a) 関心とする被検出体を含むしてもしていなくてもよい試験試料を(1)所定量の該関心とする被検出体の巨大分子特異結合パートナー、(2)請求項4記載の三座共役体及び(3)該三座体に該関心とする被検出体の該巨大分子特異結合パートナーが結合していない時に該三座体と結合することが可能な過剰量の異った巨大分子と接触させること、及び

(b) 該三座体から脇へそらされている該関心とする被検出体の該巨大分子特異結合パートナーの量を検出して該試験試料中の該関心とする被検出体の存在を測定することからなる競争免疫検定方法。

【請求項 110】 該三座共役体が請求項 23 記載の三座共役体である請求項 109 記載の方法。

【請求項 111】 該関心とする被検出体がハブテン、ホルモン、ポリペプチド、オリゴヌクレオチド及びビタミンからなる群から選ばれ、該三座共役体が請求項 24 記載の三座共役体である請求項 110 記載の方法。

【請求項 112】 該被検出体が約 100 及び 1500 ダルトンの間の分子量を有するハブテンであり、該三座共役体が請求項 25 記載の三座共役体であり、該関心とする被検出体の該巨大分子特異結合パートナーが抗体である請求項 111 記載の方法。

【請求項 113】 (a) 関心とする被検出体を含むしてもしていなくてもよい試験試料を(1)請求項 23 記載の三座共役体、(2)過剰量の該三座体の該第1

低分子配位子メンバーの巨大分子特異結合パートナー及び（３）所定量の該関心とする被検出体の巨大分子特異結合パートナーと接触させること、及び

（ｂ）該三座体から脇へそらされている該関心とする被検出体の該巨大分子特異結合パートナーの量を検出して該試験試料中の該関心とする被検出体の存在を測定することからなる競争免疫検定方法。

【請求項１１４】 該関心とする被検出体がハプテン、ホルモン、ポリペプチド、オリゴヌクレオチド及びビタミンからなる群から選ばれ、該三座共役体が請求項２４記載の三座共役体である請求項１１３記載の方法。

【請求項１１５】 該被検出体が約１００及び１５００ダルトンの間の分子量を有するハプテンであり、該三座共役体が請求項２５記載の三座共役体であり、該関心の被検出体の該巨大分子特異結合パートナーが抗体である請求項１１４記載の方法。

【請求項１１６】 該三座共役体が請求項３５記載の三座共役体である請求項１１３記載の方法。

【請求項１１７】 該関心の被検出体がハプテン、ホルモン、ポリペプチド、オリゴヌクレオチド及びビタミンからなる群から選ばれ、該三座共役体が請求項３６記載の三座共役体である請求項１１６記載の方法。

【請求項１１８】 該被検出体が約１００及び１５００ダルトンの間の分子量を有するハプテンであり、該三座共役体が請求項３７記載の三座共役体であり、該関心とする被検出体の該巨大分子特異結合パートナーが抗体である請求項１１７記載の方法。

【請求項１１９】 該三座共役体が請求項４１記載の三座共役体である請求項１１３記載の方法。

【請求項１２０】 該関心とする被検出体がハプテン、ホルモン、ポリペプチド、オリゴヌクレオチド及びビタミンからなる群から選ばれ、該三座共役体が請求項４２記載の三座共役体である請求項１１９記載の方法。

【請求項１２１】 該被検出体が約１００及び１５００ダルトンの間の分子量を有するハプテンであり、該三座共役体が請求項４３記載の三座共役体であり、該関心とする被検出体の該巨大分子特異結合パートナーが抗体である請求項１２０記載の方法。

【請求項１２２】 該三座共役体が請求項８７記載の三座共役体であり、該試験試料がさらに過剰量の該三座共役体の該第３低分子配位子の第３巨大分子特異結合パートナーを含有する請求項１１３記載の方法。

【請求項１２３】 該第１巨大分子特異結合パートナー及び該第３巨大分子特異結合パートナーが多価であり、該三座共役体が請求項８８記載の三座共役体である請求項１２２記載の方法。

【請求項１２４】 該関心とする被検出体がハプテン、ホルモン、ポリペプチド、オリゴヌクレオチド及びビタミンからなる群から選ばれ、該三座共役体が請求項９０記載の三座共役体である請求項１２３記載の方法。

【請求項１２５】 該被検出体が約１００及び１５００ダルトンの間の分子量を有するハプテンであり、該三座共役体が請求項９１記載の三座共役体であり、該関心とする被検出体の該巨大分子特異結合パートナーが抗体である請求項１２４記載の方法。

【請求項１２６】 該被検出体がテオフィリン、テオフィリンーアミン、ジゴキシン、ジソピラミド、ライドカイン、プロカインアミド、プロパノロール、キニジン、アミカマイシン、クロラムフェニコール、ゲンタマイシン、カナマイシン、ネチルマイシン、トブラマイシン、三環抗うつ剤、エソスクシミド、フェノバルビタール、フェニトイン、プリミドン、バルプロイン酸、アセトミノフェン、アセチルサリチル酸、メソトレキセート、及びモルフィネ、コデイン、ヘロインなどの悪習薬及びそれらの代謝生成物、ＤＮＰ、１－置換－４－ヒドロキシ－２－ニトロベンゼン及び４－置換－２－ニトロトリアルキルアニリニウム塩からなる群から選ばれ、該三座共役体が請求項９２記載の三座共役体である請求項１２５記載の方法。

【請求項１２７】 該関心とする被検出体がテオフィリン及びテオフィリンーアミンからなる群から選ばれ、該三座共役体が請求項９３記載の三座共役体であり、かつ該第１及び該第３巨大分子特異結合パートナーがビオチンおよびＤＮＰからなる群から選ばれる請求項１２６記載の方法。

【請求項１２８】 該三座共役体が請求項９５記載の三座共役体である請求項１２２記載の方法。

【請求項１２９】 標識、トレーサー、レポーター基及び固体支持体からなる群から選ばれる意図標識をグリコシル化タンパク質に（ａ）該グリコシル化タンパク質を請求項１７記載の三座共役体と接触させて混合物を形成させること及び（ｂ）混合物を紫外線露光することからなることにより付着結合させる方法。

【請求項１３０】 該意図標識がビオチンである請求項１２９記載の方法。

【請求項１３１】 個々に誘導体化され得る別個の３有機官能基を有する出発スペーサー基へ三座体メンバーを個々に付着結合させる三座共役体製造方法。

【請求項１３２】 該出発スペーサー基が少なくとも２つの異った官能基を有する請求項１３１記載の方法。

【請求項１３３】 該官能基の２つが同一である請求項１３２記載の方法。

【請求項１３４】 該同一官能基の１つが保護基により保護されている請求項１３３記載の方法。

【請求項１３５】 該出発スペーサー基が保護されたアミノ酸である請求項１３４記載の方法。

【請求項１３６】 該保護基がベンジルエステル、第三級ブチルエステル、カルボベンゾキシエステル、ベンゾイロキシカルボニルフタリル及び９－フルオレニルメチロキシカルボニルからなる群から選ばれる請求項

135記載の方法。

【請求項137】 該出発スペーサー基がカルボベンゾキシリシンである請求項136記載の方法。

【請求項138】 該同一官能基が自己保護基である請求項134記載の方法。

【請求項139】 該出発スペーサー基が環状酸無水物である請求項138記載の方法。

【請求項140】 該出発スペーサー基がピログルタミン酸及びS-アセチルメルカプトハク酸からなる群から選ばれる請求項139記載の方法。

【請求項141】 該出発スペーサー基が3つの異った官能基を有する請求項131記載の方法。

【請求項142】 該出発スペーサー基がメルカプトアミノ酸である請求項141記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は免疫検定に用いる共役体に関する。さらに詳しくは本発明は、競争免疫検定及びモジュレート免疫検定などに用いる新規な三座共役体、その製造方法及びそれを用いた検定方法に関する。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決使用とする課題】

#### 1. 特異結合検定

免疫化学的又はその他の形式の特異結合反応の測定方法は近年医学試験の分野において広く受け入れられるようになってきた。一般的に言えば、免疫化学反応には少なくとも一つの抗原と少なくとも一つの抗体の間の反応が含まれる。抗原は通常動物又はヒトの体内へ取り入れられた時免疫応答、すなわち、抗体生成を誘発することができるタンパク質又は炭水化物などの物質である。免疫応答の結果として生成する抗体は本質的に二価であり、通常「Y」として描写され、「Y」の各々の腕（アーム）は抗体の生成を誘発した抗原と結合することができる。患者の試験試料中に特殊な抗原又は抗体が存在することは或る病状又は肉体的な状態、例えば妊娠を示す。免疫化学反応は特殊な結合反応の一形式である。抗体のフラグメント(fragment)はしばしば免疫検定においてそのままの抗体に添加して使用されるか又はそれらの代りに使用される。一般に抗体のフラグメントには異なった3種のタイプがある。フラグメントの第1のタイプはF a b又はF (a b)として示されるが、これは通常酵素パペインによる消化によってそのままの抗体から直接開裂された抗体の1本の腕である。各F a bフラグメントは一価であり、その分子量はそのままの抗体が約150,000ダルトンであるのに対し約50,000ダルトンである。フラグメントの第2のタイプはF (a b)<sup>2</sup>として示され、これはなお互いに連結した抗体の両方の腕からなっているが尾部はペプシン消化によって除去されて存在しない。二価のF (a b)<sup>2</sup>フラグメントは約100,000ダルトンの分子量を有してお

り、さらに2個の一価F a b<sup>1</sup>フラグメント(抗体フラグメントの第3のタイプ)に開裂されることができるが、それはまたそれぞれF (a b<sup>1</sup>)として示され約50,000ダルトンの分子量を有している。

【0003】 抗体の腕が結合する抗原の部位はエпитープ(抗体決定基)と呼ばれる。大部分の抗原は多エピトープ性であり、抗体に対する多重の、かつしばしば繰り返しの結合部位を有している。免疫検定において、ほかに免疫複合体として知られる大きさの異なった大きな抗体-抗原複合体の形成を可能ならしめるのは抗原の多エピトープ性及びF (a b<sup>1</sup>)<sub>2</sub>を含めた抗体の二価性である。この特徴の利点を用いた特殊な形式の免疫検定は三成分免疫複合体が形成されるサンドイッチ免疫検定である。最も一般的な形式のサンドイッチ免疫検定では通常固体の支持体に結合させた第1の不溶化抗体及び第2の標識抗体を用いる。各抗体は関心とする抗原(すなわち、測定すべき被検出体(analyte))に対して特異的であり、抗原上の異ったエピトープと結合する。好ましくは、第1の抗体は第2の抗体が結合するエピトープから離れたエピトープと結合する。不溶性の抗体：抗原：標識抗体の三成分複合体は関心とする抗原が第1及び第2の抗体と接触した場所で形成される。各抗体はただ1個の抗原と結合することが要求されるから、抗体の3タイプのフラグメント全てがこの種の方法において使用することができよう。関心とする抗原の存否が固体支持体上の標識抗体の存否によって示される。通常、反応の不溶解化相は結合又は遊離の標識抗体のどちらかを定量するため液相から分離されねばならない。このような反応は分離段階が必要とされるので不均質タイプの反応と称される。

【0004】 ネフェロ分析及びタービジティ分析は例えば抗体及び抗原の大凝集体の形成を必要とする。各抗体は2種の異った抗原分子と結合しなければならないから一価のF a b及びF a b<sup>1</sup>フラグメントは一般的にこの方法には有効ではない。大凝集体は溶液の光散乱に変化をもたらし、ネフェロ分析及びタービジティ分析の方法によって測定することができる。これらの方法は形成された複合体を検知するのに酵素、放射性同位元素、蛍光性又は化学発光性化合物のような従来の標識を必要としない。むしろネフェロ分析法及びタービジティ分析法は直接複合体の量を測定する。分離段階を必要としないからネフェロ分析及びタービジティ分析は均質免疫検定と称される。抗原は多重エピトープ性であり、抗体は二価であるので存在する抗原及び/又は抗体の量に応じて光を散乱させるのに十分大きな抗原：抗体複合体の形成を可能にする。通常、患者の血液、血清、脳脊髄液(CSF)又は尿試料などから得られる所定量の抗原とともに過剰量の抗体が使用される。このような場合、試料中に存在する抗原の量は形成される抗原：抗体凝集体の量及び大きさを決定する上での制限因子となるであろう。

【0005】タービジティ分析においては粒子又は凝集体の懸濁液を通過する光の減少程度を測定する。その減少は凝集体による光の反射、散乱及び吸収により生じる。ネフェロ分析で測定されるのは光の直接的な通路でない場所に置かれた検知器に入る散乱光又は反射光である。タービジティ分析及びネフェロ分析においてはともに光散乱の変化率（レート）はまた存在する抗原の量の指示値として測定される。ネフェロ分析法は初期段階における抗原：抗体反応を複合体が溶液から免疫沈殿物として分離する前に光を散乱させることができるものとして成長していく速度を検知することにより監視する簡便な方法となってきた。これら複合体の生成は究極的には「散乱センター」として機能するのに十分な大きさとなる凝集体が作られることに始まる。ステーンベルグ ジェーシー、「免疫沈殿反応による特異タンパク質測定用速度ネフェロ分析」、クリニカル・ケミストリー 23：81456 - 1464（1977）。散乱センターの形成は水の多くの部分を排除することによってタンパク質-タンパク質の相互作用の確率を高めるデキストラン又はポリエチレングリコールのような親水性非イオン重合体の使用により促進することができる。免疫ネフェロ分析検定における重合体の使用はまた感度を高め抗血清消費を少なくするという利点がある。

【0006】2. ハプテン用ネフェロ分析阻害免疫検定  
ハプテンは免疫検定において独特の問題を有している。ハプテンは比較的小さい一価の分子であり、時には不完全又はフラグメント化抗原とみなされる。ハプテンの共通の分類は薬剤である。例えば、テオフィリンはこのハプテンのサブクラス(subclass)である。ハプテンはそれ自身ではヒト又は動物の体内で免疫応答を誘発することはできないが、これはハプテンが一般的に小さすぎて体内の免疫系によって認知されないからである。しかしながら、タンパク質のような担体と結合した時、ハプテン：担体タンパク質共役体は抗体生成を誘発するのに十分大きい抗原として作用する。この方法でハプテンに対抗した抗体を作ることができる。しかし、小さいハプテン分子は比較的大きい抗原と異なりそれ自身は多重エпитオク性ではない。このためハプテンはハプテンに対抗して作られた抗体で大きい複合体ないし凝集体を形成することはできない。従って、治療医薬監視用などのネフェロ分析又はタービジティ分析でハプテン検定を遂行するためハプテンが複合体形成阻害剤として作用するネフェロ分析阻害免疫検定法（NIIA）が開発された。伝統的なNIIAにおいて「顕色剤抗原」（developer antigen）として知られる第2の共役体が検知可能な光散乱を生じさせるのに十分な大きさの複合体を顕色するため用いられる。顕色剤抗原はハプテン分子の多重性部に共役した通常タンパク質である第2担体から形成される。このようにして顕色剤抗原は1個以上の抗体分子とともに凝集して究極的に光散乱センターとなることができる

「多価ハプテン」として作用する。第2担体タンパク質は時々「標識」と呼ばれる。患者の試験試料中に存在する一価の遊離ハプテンは抗体分子の腕の一方又は両方に結合することによって顕色剤抗原：抗体複合体形成量を阻害し、そのため複合体形成が減少し、光散乱量が低下する。阻害免疫検定の本質上、光散乱において検知された増加量及び増加速度はともに患者の試料中に存在するハプテンの量に反比例する。

【0007】タービジティ分析及びネフェロ分析阻害免疫検定の従来技術においていくつかの問題点が生じていた。その一つの問題点は顕色剤抗原試薬に関連している。伝統的な顕色剤抗原は一般に不安定で特殊な貯蔵条件を必要とする。特殊な貯蔵条件の必要性は顕色剤抗原の担体タンパク質が天然のタンパク質系物質であり、貯蔵中同様製造中にも比較的迅速に分解するという事実から生じている。室温において典型的な顕色剤抗原は約8時間の寿命しか期待できない。冷凍温度においてさえも大部分の顕色剤抗原は約6か月の貯蔵寿命しか示さない。このことは製造及び配送の問題に大きく関与し、この種製品のコストを高める。さらに、顕色剤抗原用担体タンパク質が天然資源から作られるものであるためこれらタンパク質の品質に相当の変動がある。伝統的な顕色剤抗原試薬は均一な反応性を確保するため注意深く調製し、精製し、特性化しなければならない。特性化工程は従来技術の顕色剤抗原の製造に関し最も経費のかかるものである。

【0008】従来技術のNIIA法はサンドイッチ免疫検定のような他の形式の免疫検定に比較して制限された感度しか有していない。この感度制限は第一に血清試料の他の成分によって生じる散乱の結果である。この理由のため、試験試料はNIIAの反応媒質に添加する前に相当希釈されねばならず、それによって反応媒質中の被検出体の濃度が希釈される。サンドイッチ免疫検定のような他の形式の免疫検定においては、典型的に約100-200 $\mu$ lの試料が反応媒質へ添加される。これと対比的に普通約1-3 $\mu$ lの試料のみがNIIA用反応媒質中へ注入される。感度改善のために提案された方法として米国特許第4,604,365号に開示された顕色剤抗原に対するハプテン：担体の比を最適化することがある。高い及び低いハプテン：担体比は中間の比において感度改善が観察されるのに対し中程度の感度となることが報告されている。しかしながら、この方法は時間がかかり、NIIA感度の顕著な上昇はもたらさない。従来技術のNIIA法において遭遇するもう一つの問題には「非生産結合」として知られる現象がある。非生産結合は、例えば、同一抗原の2本の結合腕が同一顕色剤抗原の2個のハプテン部分と結合する場合である。このような例の場合他の顕色剤抗原と結合する抗体上の遊離の腕がなくなるから他の顕色剤抗原との架橋結合が存在しなくなる。その結果高価な抗体及び顕色剤抗原試薬が十



分使用されないことになる。均質タービジ分析及びネフェロ分析抑制免疫検定法は容易かつ簡便なものであるから、一貫した特性を有するように容易に製造することができ、室温で長い貯蔵寿命を示す安定な顕色剤抗原を入手することは有利である。また、NIIAの感度を改善し、非生産結合の発生を減少させることも有利であろう。

### 【0009】3. 従来技術の二官能共役体

従来技術には数種の低分子二官能共役体(bifunctional conjugate)が存在する。ここで「低分子二官能共役体」の意味することはスペーサー基(spacer moiety)を通じて連結している2個の低分子を有する共役体である。スペーサー基はただ1つの化学結合(例えば、スペーサーに1つの原子もない)からなるような非常に小さいものであってもよい。一般に、これらの分子の大きさは約7,000ダルトン以下である。両方の分子は低分子配位子として作用し、それ自体がおのおの低分子に対し特異結合親和性を有する物質、すなわち、その特異結合パートナーと相互作用することができる。この定義において1個以上の高分子を有する共役体及び/又は特異結合パートナーを持たない1個以上の化学基を有する共役体は含まれない。例えば、サンドイッチ免疫検定における典型的な酵素標識抗体は二つの理由、すなわち、抗体部分が一般に約150,000ダルトンを越える大きさの巨大分子であること及び酵素基が基質上に作用するけれども一般にその基質に対する特異結合パートナーであると考えられていないことにより含まれない。また、2個の低分子配位子というよりも2個の化学的反応基を共役体の各末端に1個ずつ有するヘテロ二官能架橋剤も含まれない。従来技術に存在する小分子二官能共役体は2種類ある。その第一の種類の共役体はホモ二官能共役体として知られており、共役体の各末端に同一の化学基を有している。ホモ二官能共役体は一般におおの化学基と相互作用する同一の特異結合パートナーと結合するように設計されている。特異結合パートナーが多価であれば巨大な凝集体が形成されよう。

【0010】例えば、酵素の沈殿剤としてBis-NADホモ二官能共役体が提案されている。ラールソン、ピー、モスバック、ケー「酵素の親和沈殿物」エルセビエル/ノースオランダ・バイオメディカル・プレス、98

(2)、333-330(1979)。17Åのスペーサー基で分離されている2個のNADからなるBis-NAD共役体は乳酸脱水素酵素(LDH)をそれぞれのBis-NAD末端でLDHの大分子と特に結合することによって溶液から沈殿させることができる。LDHの大分子のそれぞれはNADに対する多数の結合部位を有しているからネフェロ分析で形成されるのと同等の大凝集体が得られる。これらの大凝集体は酵素を伴って溶液から沈殿析出する。スペーサー基を変えたBis-スクレオチドの同様な使用も提案されている。従来技術にお

いて応用されているその他のホモ二官能共役体の例はアビジンの構造試験に使用されているBis-ビオチン共役体である。グリーン、エヌ、エム、コニズニ、エル、トムスイー、ジェー、バレンチン、アール、シー「アビジン中のサブユニットの配列決定における二官能ビオチン化合物の使用」バイオケミストリー125、781-791(1971)。Bis-ビオチン共役体の2個のビオチン基が約1.8Åのスペーサー基で接合された場合、強力な複合体ないし高分子が多価巨大分子アビジンとの間で形成された。

【0011】従来技術の低分子二官能共役体の第二の種類はヘテロ二官能共役体である。ホモ二官能共役体と対比的にヘテロ二官能共役体は共役体の各末端で異なる化学基を有している。これらの各化学基は異なる特異結合パートナーと相互作用することができる。これら従来技術のヘテロ二官能共役体は特異結合パートナーの化学基との結合が対応する特異結合パートナーが同時に他の化学基と結合するのを阻害又は除外する場合のモジュレーターとして専ら使用されてきた。ヘテロ二官能共役体の両方の末端での同時結合はホモ二官能共役体が上記の様に使用されるところで所望の同時結合を行うために必要とされるのよりも短いスペーサー基を使用することによって一般に生じる立体障害によって阻止される。換言すれば巨大分子特異結合パートナーの共役体のモジュレーター基との結合が特異結合パートナーの信号発生原因となる化学基との結合を立体的に阻害する。従来技術のヘテロ二官能共役体は一般的にその共役体の化学基の一つとして関心とする低分子配位子、通常被検出体を用いる。この化学基はある限定量の被検出体の特異結合パートナーに対し試料からのようなフリーの被検出体と競争することができる。ヘテロ二官能共役体の他の化学基は酵素モジュレーター又は酵素の補欠分子団又は他の補因子のような「代理(surrogate)」標識である。代理標識は指示標識、通常は酵素の活性をモジュレート(modulate)する。この種の従来技術ヘテロ二官能共役体は酵素の活性度が直接抗原：抗体反応によって影響されるから一般的に均質酵素免疫検定用のものである。フリーの酵素に起因する活性度に対する結合酵素に起因する酵素活性度の量を測定するには均質酵素免疫検定の場合同様分離段階は必要でない。

【0012】酵素モジュレート免疫検定は低分子配位子：酵素モジュレーターヘテロ二官能共役体の指示酵素の活性度に影響する能力に基くものである。例えば、大型の代理標識つき共役体も開示している米国特許第4,134,792号参照。この例においては配位子基と酵素モジュレーター基との間のスペーサー基は比較的短く、好ましくはその長さは炭素原子数又はヘテロ原子数で1~10、すなわち、約1.3~14.0Åである。低分子配位子：酵素モジュレーターヘテロ二官能共役体は所定量の抗体に対し試料からの配位子と競争する。も

し低分子配位子：酵素モジュレーターヘテロ二官能共役体が共役体の配位子基を通じ抗体と結合していれば、酵素モジュレーターは指示酵素の活性度に作用することはできない。指示酵素の酵素活性度を増大又は減少させるモジュレーターを使用することができ、酵素活性度を減少させるモジュレーター、すなわち、酵素阻害剤が最も一般的に使用される。阻害モジュレーターを用いる検定では観察される酵素活性度は被検出体の濃度に逆比例する。

【0013】同様形式の均質酵素免疫検定は低分子配位子：酵素モジュレーターヘテロ二官能共役体の使用に基いている。広義では、酵素補因子は陽性酵素モジュレーター、すなわち、酵素活性度を増大させるモジュレーターとして作動する。一般に酵素は2つのグループ、すなわち、(1) 酵素の活性が全くその酵素のタンパク質の性質によるもの、(2) 最適酵素活性度が補因子と呼ばれる熱安定性の非タンパク質構造によるものに分けられる。この第2のグループの酵素を用いる免疫検定は低分子配位子：酵素モジュレーターヘテロ二官能共役体の使用を通じてそれ自身をモジュレートするものである。補因子の本質は簡単な無機イオンからより複雑な有機物質まで変化するが、その多くはビオチン及びフラビンアデニジヌクレオチド(FAD)のようなビタミン誘導体である。有機補因子はしばしば補酵素と呼ばれる。或る場合、典型的には補欠分子団(prosthetic group)を用いる場合、補因子は親酵素(個別的にはアポ酵素として知られる)のタンパク質基と通常は共有結合により固く結合している。古典的な酵素学では完全な酵素的活性酵素：補因子複合体はホロ酵素と呼ばれる。

【0014】FAD、フラビンモノヌクレオチド(FMN)又はヘムなどの或る種の補因子の残基は、例えば、低分子配位子：酵素補欠分子団ヘテロ二官能共役体に用いる特に良好な酵素補欠分子団となる。例えば、大型の代理標識つき共役体も開示している米国特許第4, 238, 565号参照。この例においては配位子基と酵素補欠分子団基との間のスパーサー基の長さは炭素原子数14未満で、より一般的には炭素原子数1~6又はヘテロ原子数で0~5、すなわち、約1.3~14.0 Åである。米国特許第4, 238, 565号によれば、配位子：補欠分子団ヘテロ二官能共役体(例えば配位子：FAD)は所定量の抗体に対し試料からの配位子と競争する。もし配位子：FAD複合体が抗体によって結合していれば、アポ酵素と結合して酵素的に活性なホロ酵素を形成することはもはやできない。観察される酵素活性度は試験試料中に存在する被検出体の濃度に直接関連する。

【0015】このヘテロ二官能共役体を用いるモジュレーターの一つの例外はカラムクロマトグラフィー精製の分野である。その物質を含有する溶液をクロマトグラフィーカラムの中を2方のうち1方を通過させることによ

って物質を精製することができる。精製の一つの方法ではカラムは溶液の特定の不純物と特異的結合もしくはそれを引き付ける基を付着含有している。別の精製方法では精製すべき物質と特異的結合する基をカラム上に固定化している。これらの基は所望の物質を溶液から引き取る。後者の場合、物質は後でカラムから溶出せねばならない。一般の配位子親和性クロマトグラフィーは後者の方式に準じ、単一の固定化配位子が脱水素酵素又はキナーゼなどの酵素のファミリーを遊離酵素で吸収し、次いで生物特定溶出に適した条件下で溶出することができるという原理に基いている。一般的な配位子としてはしばしば補因子又は補因子フラグメントが用いられる。

【0016】不溶性低分子ヘテロ二官能共役体AMP-ATPが一般の配位子親和性クロマトグラフィー用に提案されている。リー シーワイ、ラールソン ピー オー、モスバック ケー「二官能ジヌクレオチドAMP-ATPの合成及びその一般配位子親和性クロマトグラフィーにおける応用」ジャーナル・オブ・ソリッドフェーズ・バイオケミストリー、2(1)、31-39(1977)。ATP基(キナーゼに対し特異的)はセファロース(商標)4B(架橋アガロースゲル、スエーデン、ウプサラ、ファーマシア製)カラムに予め結合させたAMP基(脱水素酵素に対し特異的)を通じて結合してある。ATP基及びAMP基は両者がAMP基を通じてセファロースカラムに結合されていてもそれぞれキナーゼ及び脱水素酵素に対する親和性挙動を保持していると報告されている。溶解性のAMP-ATPジヌクレオチドを調製する試みは不成功であった。Id. これら従来技術の二官能共役体のうちネフェロ分析及びタービジティ分析検定法に応用されたものは一つもなかった。さらに、これら従来技術の二官能共役体は例えば三官能共役体で達成できるような融通性及び感度に欠けている。例えば、低分子ヘテロ二官能共役体はそれ自体がそのような共役体によってモジュレートされる或る種の検定にのみ応用が限定されているけれども、低分子ホモ二官能共役体は同じ分子と結合するためにのみ有用である。多くの種類の免疫検定においてモジュレーション機能を果たすとともに同じでない高分子を凝集することができる三官能共役体入手することは有利であろう。

#### 【0017】

4. アビジン及びビオチンの免疫検定における使用  
アビジン及びビオチンはともに天然に存在する化合物である。アビジンは比較的大きい巨大分子であり、卵白中に見出される。アビジンは4種のサブユニットを含有している。ビオチンは比較的小さく安定な水溶性ビタミンである。アビジン分子の4種のサブユニットの各々はビオチンの分子に特異的に結合することができる。アビジンとビオチンの結合反応は非常に強く、結合定数は約 $10^{15}$  L/モルである。この結合は非常に強く、ビオチンがそのカルボキシル基によって他の分子と共役した場合

又はアビジンが他の分子に付着結合した場合でさえも持続することが発見された。ビオチンが他の分子と共役した場合、その結果の共役体は通常ビオチニル化合物、例えばビオチニル化タンパク質と呼ばれる。例えば、ビオチニル化タンパク質は迅速に対応するアビジン付着結合分子と強力に結合することになる。このビオチニル化合物のアビジン共役体と結合する特徴は、成功度合いに変動はあったが、主として不均質免疫検定に用いられてきた。そのような応用のうち2件がサンドイッチ免疫検定に関係している。その1つの例においてアビジン：ビオチン結合がサンドイッチの標識端で用いられる。これは米国特許第4, 228, 237号に見られ、ここでは測定すべき配位子の特異結合パートナーをビオチニル化し、酵素標識アビジンとの共役に用いている。もう1つの例においてはビオチン：アビジン結合がサンドイッチ免疫検定で形成されるサンドイッチの不溶化末端で使用できる。例えば、米国特許第4, 298, 685号は標識つきサンドイッチが溶液中で形成された後通常添加される不溶化アビジンの使用を教示している。サンドイッチの標識付けされない抗体が予めビオチンで標識付けされた場合、不溶化アビジンは溶液から標識つきサンドイッチを捕獲することができる。これらの用途はネフェロ分析又はタービジティ分析に応用できない。さらに、試薬の調製に必要な追加共役段階はそのような方法を経済的により魅力の無いものとする。

【0018】アビジンはまた上述の低分子配位子：酵素モジュレーターヘテロ二官能共役体と同様な方法で用いられる大型の代理標識つき共役体の酵素モジュレーター標識成分として均質免疫検定に用いられてきた。アビジンはピルビン酸カルボキシラーゼのようなビオチン含有酵素の天然阻害剤である。これら酵素のビオチン基がアビジンと連結、すなわち、複合化すると酵素活性は停止ないし減少する。これはビオチンがこれら酵素に必要な補因子であり、ビオチン基が補因子として機能出来なくなる場合酵素活性が阻害されるからである。従ってアビジンは基質上に作用させるとある種の均質免疫検定システムにおいて測定し得る信号が得られるビオチン含有酵素の活性をモジュレートないし制御できる能力によってモジュレーター標識として使用することができる。米国特許第4, 550, 075号は均質免疫検定に使用する大型の標識つき共役体のモジュレーター標識成分としてのアビジンを開示している。米国特許第4, 550, 075号の標識つき共役体は大部分のモジュレーター標識、すなわち、酵素阻害剤よりもかなり大きい約63, 000ダルトンというアビジンの大分子サイズの利点を利用している。このことはアビジンが大型代理標識つき共役体について典型的に遭遇する立体障害問題を緩和することを可能にする。例えば、低分子配位子：酵素モジュレーターヘテロ二官能共役体が使用される場合、比較的小型の典型的な低分子量酵素モジュレーターはその共

役体の配位子部分のそれに対比し得るものであり、それゆえモジュレーターは検定において有効に機能することができる。しかしながら、配位子が抗原である場合のように配位子が通常の酵素モジュレーターよりも非常に大きい場合、典型的な酵素モジュレーターは配位子の大きさによって阻害され、モジュレーター標識の活性度は配位子成分による特異結合パートナーとの結合が存在しなくても立体的に阻害される。

【0019】この立体障害問題は前述の米国特許第4, 238, 565号で或る程度取り上げられており、配位子が比較的分子量が大きい分子の場合若干長いスパーサー基を用いることが提案されている。どの場合でもスパーサー基はその長さが炭素原子数約14及びヘテロ原子数0-5を越えない。目標は立体障害が共役体の配位子基がその特異結合パートナーと結合しているときにのみ起き、その共役体の配位子基が遊離状態の時にのみ起きないことにある。これに反し、米国特許第4, 550, 075号では単に抗原のような大配位子が巨大分子酵素モジュレーターアビジンの活性を立体的に阻害することができないという利点を取り上げている。立体障害は配位子基がその特異結合パートナーと結合した時にのみ発生する。アビジン：ビオチン結合は高度の特異性及び結合強度がネフェロ分析及びタービジティ分析操作として好ましく見えるけれどもそれらに使用されなかった。複合体形成におけるアビジン：ビオチンの唯一の使用は前述のアビジンを凝集させるためのBis-ビオチンの使用である。同様に、アビジンは所望の立体障害を作り出すために使用されなかったが、その代りにモジュレート検定に使用される二官能共役体の被検出体のメンバーが巨大分子抗原である場合に立体障害を避けるためにも使用された。巨大分子の特異結合パートナーであるアビジンの立体障害誘発能力を、特にNIIA検定及びモジュレート検定に利用することは望ましいことである。

#### 【0020】5. 従来技術の接近検定

標識抗原の標識部分と標識抗体の標識部分が互いに密接に接近した時両標識間に抗原と抗体間の特異結合反応に準じた測定可能な相互作用が生じる免疫検定法には従来技術として数種の方法が存在する。これらの免疫検定は測定可能な反応を生じ得る前に標識が互いに接近することが必要であるから「接近検定」と称することができる。接近が関心とする被検出体などの標識抗原又はハプテンと標識抗体の結合によって生じた場合、接近した標識間の相互作用から得られる信号は試験試料中に存在する抗原又はハプテンの量に相関させることができる。接近標識を用いる大部分の検定は発生した信号の量が試料中に存在する被検出体の量に逆比例する競争検定である。「酵素チャンネル」(enzyme channeling) 検定として知られる接近検定の一つの方式は標識として多酵素複合体からの酵素対を使用する。多酵素複合体はしばしば

天然に発生し、一連の反応に含まれる2種以上の酵素からなっている。換言すれば、一つの酵素生成物が第二の酵素の基質となる。第二の酵素生成物が第三の酵素の基質となり、これが続く。酵素チャンネル検定は多酵素複合体中で次々と作動する2種の酵素を利用する。便宜上、2種の酵素を第1酵素及び第2酵素と呼ぶことにするが、ここに第1酵素は第2酵素の基質として作用する。

【0021】酵素チャンネル検定の1例ではヘキソキナーゼ(HK)とグルコース-6-リン酸脱水素酵素(G6PDH)をそれぞれ第1酵素及び第2酵素として使用する。リットマン ディー ジェー、ハンロン ティー エム、ウルマン イー エフ「酵素チャンネル免疫検定：新物質酵素免疫検定技術」アナリティカル・バイオケミストリー106、223-229(1980)。第1酵素(HK)は所定量の抗体と関心とする抗原に結合される。第2酵素(G6PDH)及び関心とする被検出体と同じか又は類似の抗原はともに結合して細孔ビーズとなる。患者の試験試料によりもたらされる遊離抗原が存在しない場合、抗体と結合したすべての第1酵素が予め結合した抗原を通じてビーズに結合するような「チャンネル系」が存在する。「未チャンネル系」では第1酵素がすべて遊離のままで存在する。このことは試験試料によりもたらされる遊離抗原が十分あって所定量の酵素標識抗体と結合する抗原に対し非常に効果的に競争するので酵素標識抗体のいずれもビーズと結合することができない場合に生じる。ビーズと結合した酵素標識抗体の量は試験試料中に存在する遊離抗原の量の直接関数であり、特殊な系で得られるチャンネル化度に相関させることができる。チャンネル化度もしくは「チャンネル効率」は通常第2酵素により作られる生成物の量を測定することにより検出される。この生成物は第2酵素がそれに密接接近した第1酵素によって作られた生成物に作用し得る場合にのみ生成される。

【0022】例えば、HKが第1酵素である場合、その反応生成物、グルコース-6-リン酸は結合した第2酵素、G6PDHにより作用され、HK標識抗体もビーズに結合する。この例において、グルコース-6-リン酸はそれが溶液中へ逸出する前にG6PDHがそれに作用し得るほどG6PDHが部分的に高濃度である接近箇所内で生成される。その系の「チャンネル効率」は第1酵素生成物が溶液中へ逸出する前に第2酵素によって転換された第1酵素生成物の量で、試験試料中に存在する被検出体の量に逆比例する測定値である。もう1つの形式の接近検定ではエネルギー転移として知られる現象を利用する。エネルギー転移接近検定において測定される相互作用は通常1つの標識から第2の接近配置標識への光、すなわち、エネルギーの転移によって生じる発光の変化乃至シフトである。エネルギーがそこから転移する標識は「供与体標識」と呼ばれ、一方エネルギーそこへ

転移する標識は「受容体標識」と呼ばれる。ある特殊なエネルギー転移検定は供与体標識として免疫グロブリンG(IgG)及び環状AMP(cAMP)などの化学発光標識生物学的配位子を用い、受容体標識としてそれぞれ蛍光標識抗体を利用する。パテル エー、ダビース シー ジェー、キャンベル エー ケー、マクキャブラ エフ「化学発光エネルギー転移：生体系における配位子・配位子相互作用研究用新技術」、アナリティカル・バイオケミストリー、129、162-169(1983)。化学発光化合物は化学反応の結果として光を放射する。この特殊なエネルギー転移検定は蛍光標識が化学発光標識に密接接近状態にされた場合に化学発光標識によって生成された光、すなわち、エネルギーの全部又は一部がフルオレセインなどの蛍光標識に転移され得る事実を利用している。接近は化学発光標識配位子とその蛍光標識特定結合パートナーとの間の特異反応によってもたらされる。

【0023】化学発光標識によって生成されたエネルギーの蛍光標識による吸収は一般に約460と487nmの間の放射光の減少及び約525と555nmの間の放射光の増加となる。1d. シフトが観察される正確な波長範囲は標識として選択された化学発光及び蛍光化合物に依存する。典型的なこの形式の競争結合検定において、試験試料からの遊離被検出体は化学発光標識被検出体と有限量の蛍光標識抗体について競争する。シフトの量は試験試料中に存在する遊離被検出体の量に逆比例する。試験試料中に存在する被検出体量に逆比例するのでなく直接正比例する競争接近検定用試薬を入手することは有利であろう。接近検定に用いる改善された安定性を示す試薬を入手することもまた有利であろう。化学発光標識抗原は9か月間安定であると報告されているが、この安定には-20℃での貯蔵が必要である。1d. この種の試薬が室温において安定であることは望ましいことである。

#### 【0024】6. 従来技術の共役方法

大部分の特異結合検定は1形式又はもう1形式の共役体の使用を必要とする。例えば、典型的なサンドイッチ免疫検定は酵素又は蛍光化合物のような標識とサンドイッチの標識抗体として機能する抗原との共役体を必要とする。共役体はまた合成反応を含む他の方法にも使用される。共役体は単に2つの物質が互いに結合したものである。通常その物質の少なくとも1つはタンパク質である。酵素標識抗体を用いるようなある場合には両方の物質がタンパク質である。大部分のタンパク質はある種の他の物質と同様活性部位を有しており、そのうちのいくつか又は全てがその共役体の究極的な所望の性能に重要である。活性部位の例としては酵素の活性部位、抗体の結合アーム及び抗原又はハプテンのエピトープが挙げられる。活性部位を有するタンパク質又は他の物質を複合する場合共役、すなわち化学修飾を活性部位から離れて

行うことが重要である。

【0025】共役方法は一般に必要なタンパク質の化学修飾を行うために比較的過酷な条件を用いる。これはタンパク質の変性及び／又は失活の原因となり得る。さらに、これらの方法はタンパク質の活性部位の特殊な形式をそのタンパク質の活性部位又はその近くで生じるか否かに関係なく捜し出す無差別なものである。タンパク質共役体においてもっとも一般的な反応性部位はアミノ基及びカルボキシル基である。ただし表面スルフヒドリル基もしばしば用いられる。これらの反応は本来無作為的なものであり、タンパク質がこれらの特殊な反応基を活性部位の近くに有するという問題を生じる。過酷な反応条件による問題を緩和するため提案された方法の一つはヘテロ二官能架橋剤のメンバーにアジド ( $N_3$ ) を使用することである。前述したように、ヘテロ二官能架橋剤は2種の低分子配位子ではなく2種の化学的反応基を利用するものであるから低分子ヘテロ二官能共役体とは区別されるべきである。架橋剤のアジド基は紫外線露光により容易に活性化ナイトレンに転化する。その後活性化ナイトレンは過酷な反応条件を用いなくても殆ど全ての化学結合の中に挿入することができる。

【0026】特に、1つの化学的反応基としてカルボン酸残基のスクシンイミドエステル及び他の化学的反応基としてアジド残基を使用するヘテロ二官能架橋剤が2種タンパク質の共役に使用することが提案されている。ガイル ピー、フリガー ディー、ホグソン ジェー「酵素の哺乳類細胞への光化学的共役」ファーマティカル・リサーチ・コム9(2)、131-141(1977)。第1タンパク質を含有する溶液にはじめ過剰の架橋剤を添加する。カルボン酸残基のスクシンイミドエステルは無差別に第1タンパク質のどれかのアミノ官能基と結合する。この反応はアジド残基の反応性により暗所で行われる。スクシンイミドエステルとアミノ基の間の反応が生じ、過剰の架橋剤を除去した後第2タンパク質を添加し、反応混合物を紫外線露光してアジド残基をナイトレンに転化する。ナイトレンは極度に反応性であり、この反応形式で、第2タンパク質のどれかの化学結合中に挿入され、架橋剤の活性ナイトレン末端に容易に利用される。この複合化の第2段では比較的緩和な反応条件が用いられるが、第1タンパク質がその活性部位に臨界的な反応性の遊離アミノ基を有していない場合にのみ比較的良好な回収が達成される。どの場合もナイトレン挿入の無差別性によって優れた回収はできない。

【0027】もう1つの共役方法は部位特異性の問題を取り上げているが、過酷な条件問題を緩和するに至っていない。この方法ではタンパク質の多糖基を複合部位として使用することに的を置いている。大部分のタンパク質はその活性部位から離れた部位に位置した表面多糖基を含有し、多糖基の位置は変性用に理想的な配置となっている。タンパク質の活性部位にはこれらの多糖基は含

まれていない。従って、活性部位を化学修飾するには危険はない。多糖基の変性は一般的にシスージオール基の反応性を含んでいる。しかしながら、伝統的にこれには(1)シスージオール基の過ヨウ素酸塩酸化とこれに続く(2)還元性アミノ化を必要とする比較的過酷な反応条件が課されている。比較的緩和な条件で進行するばかりでなく、タンパク質の活性部位が未変性で残るような差別的な方式で行われるタンパク質共役方法を持つことが望ましい。

【0028】

【課題を解決するための手段】本発明は一般的に種々の目的の試薬の調製とともに分析方法用として使用することができる新規な三座共役体、その製造方法及びそれを用いた免疫検定方法を提供する。この三座共役体は互いに適切なスペーサー基を通じて結合した3種の化学基すなわち、三座体メンバーを持つ三官能共役体である。三座体メンバーのうち少なくとも2つは低分子である。三座体メンバーのうち1つ以上が低分子配位子：特定パートナー対の配位子部分であってよい。1実施態様として、三座体メンバー及びスペーサー基は巨大分子の三座体メンバーの1つとの結合が他の巨大分子の残余の三座体メンバーの1つとの結合を立体的に阻害するように選択及び調整される。もう1つの実施態様では三座体メンバーの1つがガイド(案内)として作用する、換言すれば、巨大分子の第1位置に結合しその間残余の三座体メンバーの1員が第1位置に近接した同じ巨大分子の第2位置に結合するように選択される。後者の三座体メンバーの結合に続いて前者、すなわち、ガイド三座体メンバーの結合は解消されてもよい。

【0029】本開示の文中において次の用語は特に示さない限り次のように定義される：

配位子：複合体又は共役体中のより小さい分子で、特異的により大きい分子又は物質と結合するもの。この配位子は天然に存在するものであってもよいし、人工的に処理したものであってもよい。

特異結合パートナー：複合体又は共役体中のより大きい分子又は物質で特異的により小さい分子と結合するもの。特異結合パートナーは他の物質を除いて配位子と特異的に結合する親和力を有している。特異結合パートナーは天然に存在するものであってもよいし、人工的に処理したものであってもよい。例えば、抗体フラグメントはこの定義に含まれる。

配位子類似体：配位子と殆ど同じ方法でその配位子の特異結合パートナーと結合することができる配位子分子の類似体。ここで用いる「配位子」は全般的に配位子類似体及び免疫化学的に均等の物質を含むものである。

低分子配位子：大きさが約7,000ダルトン未満の配位子。低分子配位子は抗原のようなより大きい配位子の一片ないしフラグメントであってよい。低分子配位子が抗原の断片である場合、そのフラグメントはまるごと

の抗原に対して抗体が有しているのと同じ又は同程度の親和性で抗体に抗原として認知されるものでなければならぬ。

低分子：大きさが約7,000ダルトン未満の化学基(chemical moiety)。

化学反応基：他の化学基と共有結合を形成することができる化学基。

接近標識：互いに接近して配位したとき信号を発生することができる2以上の分子のうちの1分子。

巨大分子：大きさが約10,000ダルトンを越える大きい分子又は物質。

同時結合：同じ三座共役体の二つ以上の三座メンバーが同時に巨大分子と結合する能力。一方の巨大分子との結合が事実上他の巨大分子の結合前に生じてよい。

【0030】本発明によれば新規な三座共役体ないし三座体が、その製造方法及びその使用方法とともに提供される。三座共役体の意味するものは適切なスペーサー基を通じて付着結合した(attached)3個の化学基、すなわち、三座体メンバーを有する三官能共役体である。一般に三座体メンバーの2つ以上は巨大分子と相互作用することができる低分子である。これらの低分子メンバーは同じ巨大分子と相互作用してもよいし、又は異った巨大分子と相互作用してもよい。三座体メンバーの3つともに低分子配位子であってもよい。本発明の三座体を使用することができる低分子配位子の特定例には、インシュリン、ステロイドホルモン、甲状腺ホルモンなどのホルモン類、B<sub>12</sub>、葉酸、ピオチンなどのビタミン類、1-置換-2,4-ジニトロベンゼン(ジニトロフェノール又はDNPとして知られる)、薬剤などのハプテン類、抗原フラグメントなどのポリペプチド類が含まれる。代表的な低分子配位子：特異結合パートナーはホルモン：レセプター、ハプテン：抗体、ポリペプチド：抗体、オリゴヌクレオチド：相補的DNA又はRNA、ピオチン：アビジン、ビタミンB<sub>12</sub>：内因子、葉酸塩：葉酸塩結合タンパク質、インシュリン：抗インシュリンである。三座体メンバーは選択されて、三座共役体上に選択されたスペーサー基を通じて配列される。このことにより三座体メンバーは選択されたそのスペーサー基によって三座体に付与された所定の立体的性質に従って作動することができるようになる。明瞭化のために、三座体メンバーはしばしば第1三座体メンバー、第2三座体メンバー、第3三座体メンバーと呼ぶことにする。第2三座体メンバーは第1三座体メンバーと第3三座体メンバーの間に位置する。スペーサー基は一般に「Y」で示され、「Y」のそれぞれの腕と三座体メンバーの1員と結合した尾部を有している。換言すれば、第1及び第2三座体メンバーを連結するスペーサーの区分の一部は第1及び第3三座体メンバーを連結するスペーサーの区分の一部と共通である。例えば、図7参照。従って、第1三座体メンバーはまた第2と第3三座体メンバーの「間」

に位置し、第3三座体メンバーは第1と第2三座体メンバーの「間」に位置する。

#### 【0031】好ましい実施態様

##### 1. 立体障害

本発明の1実施態様において、三座体は立体障害、もしくは立体障害の現象を利用するよう設計される。この実施態様は立体障害実施態様と呼ぶことができる。この第1実施態様において好ましくは三座体メンバーの少なくとも2つがそれぞれ異った巨大分子特異結合パートナーと結合する低分子配位子である。三座体メンバーはその三座体メンバーの特異結合パートナーとの結合がもう1つの三座体メンバーがその対応する特異結合パートナーとの結合を立体的に阻害するように選定され、配置される。便宜上第2三座体メンバーを「モジュレート(modulating)メンバーと呼ぶことにするが、これは巨大分子と結合した時立体障害を生じるべき三座体メンバーである。巨大分子の三座体の第2(モジュレート)メンバーとの結合は三座体の第1及び/又は第3メンバーが通常それぞれの特異結合パートナーである対応する巨大分子との同時結合を阻害する。本発明の立体障害実施態様を実際に適用する例は特に競争モジュレート免疫検定(competitively modulated immunoassay)の分野においていくつかある。三座体メンバーのすべてが巨大分子特異結合パートナーと結合する低分子配位子である場合、第1及び第3の三座体メンバーを連結するスペーサー基の区画はモジュレート第2三座体メンバーのその特異結合パートナーとの結合が存在しない時に第1及び第3の三座体メンバーがそれぞれの特異結合パートナーと同時結合することができるのに十分な長さでなければならない。

【0032】第2メンバーのスペーサー基上の位置も同様に臨界的なものである。第1及び第2三座体メンバーを連結するスペーサー基の区画及び/又は第2及び第3三座体メンバーを連結するスペーサー基の区画は第2メンバーがその特異結合パートナーと結合した時モジュレーションをもたらすのに十分な長さでなければならない。巨大分子の第2三座体メンバーとの結合は第2三座体メンバーが残余の三座体メンバーのいずれかと如何に接近した位置にいるかに応じて第1三座体メンバー、第3三座体メンバー又はそれら両方のそれぞれの結合を立体的に阻害する。モジュレーションが生じるには巨大分子の残余三座体メンバーの少なくとも1つとの結合が阻害されねばならない。3種の低分子配位子が三座体メンバーとして用いられた場合、本発明の立体障害実施態様は一般に競争モジュレート免疫検定において普遍的に使用することができる。それゆえこの実施態様は汎用(普遍的)三座体と呼ぶことができる。第1及び第3三座体メンバーに対応する特異結合パートナーが多価体である場合、この種の免疫検定はNIIA法を含む分野まで拡大することができる。この三座体は関心とする被検出体

が分子量約100～1500ダルトンのハプテン又はその類似体である場合の競争モジュレート検定に特に有用である。三座体がモジュレーション検定の競争形式で一般に使用することを意図するものである場合、第2三座体メンバーは関心とする被検出体と同じになるよう又は類似するように選定される。第2三座体メンバーは特異結合パートナー（通常抗体）と同じである遊離被検出体に対し競争し得ることが必要である。この抗体、いわば被検出体-特異抗体は所定量存在する。第1及び第3三座体メンバーは好ましくは関心とする被検出体とは異なる小分子配位子：特異結合パートナー対の配位子部になるよう選定される。第1及び第3三座体メンバーは同じ低分子配位子であってもよいし、異った低分子配位子であってもよい。好ましい1実施態様において第1及び第3三座体メンバーはともにビオチン基である。

#### 【0033】A. ネフェロ分析検定

前述のように、三座体の立体障害実施態様は各第1及び第3三座体メンバーの特異結合パートナーが多価体であるモジュレートNIIAに適用することができる。このような多価特異結合パートナーのおおのはそれが結合する各三座共役体の対応する低分子配位子メンバーを通じて少なくとも2個の三座体と結合することができる。このようにして、モジュレーション（高分子の第2メンバーとの結合）が存在しないと光散乱センター中に保持されるのに十分な長さの大凝集体を形成することができる。通常被検出体-特異抗体又は巨大分子抗体フラグメントである特異結合パートナーが三座共役体の第2メンバー位置と結合することが第1及び/又は第3三座体メンバーのそれぞれの特異結合パートナーとの同時結合を阻害することによって複合体化をモジュレートする。試験試料に由来する遊離被検出体の存在は適用し得る被検出体-特異抗体と結びつき、それによりモジュレーションは低減し、複合体形成が増える。本発明のこの好ましい三座体を用いるNIIAを図1に示す。この提示において、巨大分子の第2メンバーとの結合は第1及び第3三座体メンバーのそれぞれの特異結合パートナーとの結合をともに阻害する。第1三座体メンバーはビオチンである。ビオチンは63,000ダルトン前後の分子量を有する多価アビジン分子と特異的に結合する。第2三座体メンバーは関心とする被検出体と同一のテオフィリンなどの第1ハプテンである。第3三座体メンバーは関心とする被検出体とは異なったDNPのような第2ハプテンである。第2及び第3メンバーはそれぞれ約150,000ダルトンの分子量を有するそれらの多価抗体と特異的に結合する。これらの抗体は図1Aに示すように複数の第1又は第2ハプテン分子と共役した担体タンパク質を動物に注射することによって作られる。

【0034】三座体が第2ハプテンの抗体及びアビジンとのみ接触する場合には第1及び第3メンバーの同時結合が生じる。しかし、第1ハプテンの抗体（被検出体）

も反応混合物中へ添加されると、この抗体の三座体のモジュレート第2メンバー位置との結合によって複合体化は阻害される。この場合、図1Bに示すように、被検出体-特異抗体の第2三座体メンバーとの結合が対応する特異結合メンバーの第1及び第3メンバー両方への同時結合が立体的に阻害される。試験試料からの遊離被検出体（第1ハプテン）が存在すると、図1Cに示すように、被検出体-特異抗体は遊離被検出体によって三座体の第2メンバー位置から遠ざけられ、それによりモジュレーションは低減し複合体形成が増える。これにより信号すなわち複合体形成の増加が遊離ハプテンの濃度増加と正比例する結果となる。ここに提案したビオチン-テオフィリン-DNP三座体に加えてビオチン-テオフィリン-ビオチンを含む他の三座体はテオフィリンがまた三座体の第2（モジュレート）メンバーであるテオフィリン又はテオフィリン-アミン用のNIIAにおいて同等によく作用する。本発明の三座体を用いるNIIAなどの競走モジュレート検定において効果的に検定できるその他の薬剤の例にはジゴキシン、ジソピラミド、ライドカイン、プロカインアミド、プロパノール、キニジン、アミカマイシン、クロラムフェニコール、ゲンタマイシン、カナマイシン、ネチルマイシン、トブラマイシン、三環抗うつ剤、エソスクシミド、フェノバルビタール、フェニトイン、プリミドン、バルプロイン酸、アセトミノフェン、アセチルサリチル酸、メトトレキサートなどの治療薬及びモルフィネ、コデイン、ヘロインなどの悪習薬及びそれらの代謝生成物が含まれる。三座共役体を用いて検定することができる他のハプテンの例にはDNP、1-置換-4-ヒドロキシ-2-ニトロベンゼン及び4-置換-2-ニトロトリアルキルアニリニウム塩が含まれる。従来技術の顕色剤抗原とは異り、この三座体は延長された貯蔵寿命を享受でき、かつ従来技術の共役体固有の経費のかかる精製及び特性化操作を必要としない安定で化学的に一定の有機化合物である。また本発明の三座体は複合体化が典型的な従来技術の顕色剤抗原に共役した複数のハプテン部分の競争ではなく三座体のただ1つの部分、すなわち、第2（モジュレート）メンバーの遊離被検出体との競争という事実によるため感度が改善されている。従来技術の非生産的結合の問題もまた排除されている。

#### 【0035】B. 接近検定

この同じ汎用三座体が接近標識を用いる方法を含む他の形式の競争モジュレート検定に一般的に用いることができる。これらの検定は前述の同じ群の被検出体を検出するのに特に有効である。これらの検定において、第2三座体メンバーは再びモジュレーターとして作用する。1つの接近標識は三座共役体の第1三座体メンバーの特異結合パートナー巨大分子に付着結合され、その他の接近標識は三座共役体の第3三座体メンバーの特異結合パートナー巨大分子に付着結合される。2つの巨大分子が第

1 及び第 3 三座体メンバーと同時結合する場合、測定し得る反応が 2 つの接近標識間に生じる。第 2 三座体メンバーの特異結合パートナー、すなわち、被検出体－特異抗体はモジュレート第 2 三座体メンバーと結合する場合少なくとも 1 つの標識巨大分子は第 1 又は第 3 三座体メンバーのいずれかと同時結合するのを阻害される。汎用三座体の第 1 及び第 3 三座体メンバーを連結するスペンサー基の区画は標識巨大分子の同時結合を許容するのに十分な長さでなければならない。しかしながら、同時に、このスペンサーの区画の長さは標識が測定し得る反応をなし得るのに十分密接接近させられるのに十分な長さでなければならない。所要の接近をするために必要とされる長さは選定された接近検定法の形式そのものにより或る程度変るが、一般に比較的長い。例えば、接近標識間のエネルギー転移は 70 Å の長さで発生する。

【0036】酵素チャンネル検定では第 1 酵素は好ましくは第 1 又は第 3 三座体メンバーのどちらかの特異結合パートナーと付着結合され、第 2 酵素は残余の第 1 又は第 3 三座体メンバーに対応する特異結合パートナーに付着結合される。酵素チャンネル検定用の良好な酵素対にはグルコースオキシダーゼとペルオキシダーゼ及びヘキソキナーゼとグルコース 6-リン酸脱水素酵素の対が含まれる。第 2 三座体メンバーは関心とする被検出体と同じか又は類似体であり、試験試料からの遊離被検出体に対し所定量の被検出体抗体について競争する。被検出体－特異抗体の第 2 三座体メンバーとの結合が存在しなければ第 1 及び第 2 酵素を担持する巨大分子は第 1 及び第 3 三座体メンバーと同時結合することができ、第 1 酵素の生成物はそれが溶液中へ逸出する前に第 2 酵素によって転化されることができる。しかしながら、試験試料からもたらされる遊離被検出体が僅か又は皆無であれば、被検出体－特異抗体は第 2 三座体メンバーと結合することができ、酵素標識つき巨大分子がそれぞれ第 1 及び/又は第 3 三座体メンバーとの結合を立体障害し、それによって酵素チャンネルをモジュレート、すなわち、信号低減が生じる。試験試料からの遊離被検出体の量が多ければ多いほど、抗体の三座体との結合は少なくなる。モジュレートは減少し、酵素チャンネルは発生する信号量同様増加する。

【0037】エネルギー転移検定においても、同様に、供与体（ドナー）標識は好ましくは第 1 又は第 3 三座体メンバーのどちらかの特異結合パートナーに付着結合され、受容体（アクセプター）標識は残余の第 1 又は第 3 三座体メンバーに対応する特異結合パートナーに付着結合される。NIIA 及び酵素チャンネル法の場合のように、第 2 三座体メンバーは関心とする被検出体と同じか又は類似体である。第 2 三座体メンバーは試験試料からの遊離被検出体に対し所定量の被検出体抗体について競争する。試験試料からの遊離被検出体の量が多ければ多いほど、第 2 三座体メンバーと結合しているモジュレ

ート位置からの被検出体－特異抗体の転換する量は増加する。被検出体量が少ないとエネルギー転移、従って信号量が減少する結果となる。本発明の三座体を用いるエネルギー転移検定に数種の供与体－受容体対を適用することができる。供与体標識は一般に外部エネルギーを吸収して光エネルギーを放射するものでなければならない。良好な供与体標識の例には蛍光性化合物、シンチレーション染料及びイソルミノール、アクリジンエステルなどの化学発光化合物が含まれる。受容体標識は通常供与体から放射されたエネルギーを吸収しその供与体放射光エネルギーの波長よりも長波長の蛍光を放射することができる蛍光化合物である。好ましくは受容体は良好な蛍光効率を有するべきである。良好な受容体標識にはフルオレセイン、ローダミン、蛍光ランタニドキレート及びプロトポルフィリンの蛍光スズ又は亜鉛誘導体が含まれる。ローダミンは供与体によって放射される広範囲の波長スペクトルエネルギーを吸収することができるので、特に良好な受容体標識である。良好な供与体：受容体対の例はイソルミノール：フルオレセイン、アクリジンエステル：フルオレセイン及びフルオレセイン：ローダミンである。

【0038】さらに本発明のもう 1 つの好ましい立体障害実施態様において、汎用三座体以外の三座体が接近標識を用いる競争モジュレート検定に利用される。これらの検定においては 2 つの三座体メンバーのみが低分子配位子である三座体が使用される。これらの低分子配位子のうちの 1 つは遊離被検出体と所定量の被検出体－特異抗体について典型的に競争することが好ましい。他の低分子配位子は第 1 接近標識と共役されている巨大分子特異結合パートナーと結合する。被検出体－特異抗体が第 2 メンバー位置と結合していると標識巨大分子は同じ三座体の結合から立体障害される。第 2 メンバーによるモジュレーションが存在しないと、第 1 接近標識は次のうちの 1 つの方式で第 2 接近標識と好ましく接近する：

（1）第 2 接近標識が三座体メンバーとして直接三座体に共役される、又は（2）複数の第 2 接近標識が三座体メンバーとして直接三座体に共役されている大きい巨大分子ないし固体支持体に結合する。後者の場合、特に三座体メンバーの 1 つが固体支持体である場合には、図 11 に示すように、多数の三座体が同じ固体支持体を共有する。第 1 接近標識を含有する特異結合パートナーがどの程度三座体メンバーと結合できるかが発生する信号の量を制御する。試験試料からの遊離被検出体は被検出体－特異抗体をその三座体上のモジュレート位置から離して転換することにより信号を増加する。本発明の三座体は接近検定においてネフェロ検定の場合と同様全般的な利点を提供する。合成有機三座体であり一定の化学性質によって大部分の従来技術試薬の基礎となっている天然由来のタンパク質系物質を利用する際典型的に遭遇す



る問題の多くを緩和する。この三座体は従来技術試薬のような経費のかかる単離や特性化操作を必要としない。抗原の場合のようにモジュレート三座体メンバーとして抗原フラグメントを有効に使用することができるこれらの方法を用い同じハブテンや薬剤を簡便に検定することができる。

#### 【0039】2. ターゲット標識

本発明のもう1つの実施態様は領域特異標識(region-specific labelling)又はターゲット標識と呼ぶことができる他の立体現象を利用するよう設計された三座体を使用する。この三座体の少なくとも2つのメンバーは低分子である。これら2つの低分子メンバーは同じ巨大分子と結合することができ、これら2つの低分子メンバーのうち少なくとも1つは化学的活性基である。第3三座体メンバーは低分子配位子でもよく、低分子配位子以外の低分子であってもよく、巨大分子であってもよい。三座体のターゲット標識実施態様はある特定の巨大分子の1つ又は複数のターゲット部位に低分子配位子又は他の三座体メンバー結合することが望まれる場合に有利に使用することができる。この第3三座体メンバーは標識、トレーサー又はリポーター基として作動してよい。また第3三座体メンバーが高分子である場合のように固体支持体として作動してよい。例えば、ビオチンは低分子配位子標識として用いることができる。I<sup>125</sup>のような放射性物質は低分子トレーサーとして良好な例である。酵素は良好な巨大分子標識である。一般原理的に、第1低分子三座体メンバーの結合は化学反応性の第2低分子が同じ巨大分子の特殊な領域に結合するのを制止する。巨大分子上のターゲット部位に配置して最初にそれと結合すべき低分子三座体メンバーは化学的活性の基であっても低分子配位子であってもよく、ガイド三座体メンバーと呼ばれる。このようにガイドメンバーが結合した同じ巨大分子上の近辺もしくは領域での結合が抑止される低分子三座体メンバーは反応性三座体メンバーと呼ばれる。反応性メンバーは化学的活性基でなければならない。第3三座体メンバーはたとえそれが事実上固体支持体であっても便宜上「意図標識(intended label)」と呼ばれる。ガイドメンバーと反応性メンバーを連結するスペーサー基の区画の長さは好ましくは比較的短く、一方反応性メンバーと意図標識を連結するそれは比較的長い。

【0040】本発明のターゲット標識実施態様は特に意図標識をプロテオグリカン、リボタンパク質、酵素、抗体及びレセプターなどのタンパク質と複合させて用いられる。前述したように、大部分のタンパク質はその分子の活性部位から離れた位置に多糖基又は糖基を含んでいる。このような多糖基又は糖基を含有するタンパク質はグリコシル化タンパク質と呼ぶことができる。従来技術の方法と異なり、この三座体はタンパク質を変性しかなない過激な反応条件や非特異結合を招くことなくタンパク

質の多糖基にターゲットモディフィケーションすることができる。例えば、三座体をタンパク質のターゲット標識づけに使用する場合、三座体メンバーは好ましくは次のものから選ばれる：(1)ガイドメンバーはフェニルボロン酸残基、(2)反応性メンバーはニトロフェニルアジド残基、(3)残りの三座体メンバーはビオチンなどの意図標識。ガイドメンバーの置換ボロン酸基はタンパク質の糖基のシスドール基を捜し出しこれと反応して比較的弱いボロン酸エステル複合体ないし結合を形成する。この反応は暗所で行われる。過剰の三座体を除去した後、反応混合物は紫外線露光され、反応性メンバーのアジド基を活性化してナイトレンにする。次いでナイトレンは予め結合したガイドメンバーの近辺内のどれかの化学結合中に挿入される。これによりタンパク質の活性部位から離れた永久結合が確立される。続いてpH変化によるボロン酸エステルの加水分解などによるガイドメンバーの脱離が行われるが、これは三座複合体の機能的有用性を損なわない。第3メンバーが永久結合を通じてタンパク質に結合される。この反応は特異的で、条件は緩和である。

#### 【0041】三座共役体の合成

##### 1. 一般論

三座体の合成はその最終的な用途が決定され、三座体メンバーが選定されれば比較的容易である。次にこれらの決定によりスペーサー基の大きさ及び構造が決まる。その三座体がNIIA、酵素チャンネル又はエネルギー転移検定などのモジュレート検定での使用を意図するものであれば、三座体メンバーは好ましくは上記に示唆したように選定される。その他のモジュレート検定法での使用を意図するものであれば、三座体メンバーは同様な方法で選定されよう。換言すれば、第2三座体メンバーは好ましくは関心とする被検出体と同じか又はその類似体であり、第1及び第3メンバーの少なくとも1つは好ましくは低分子配位子：特異結合パートナー対のなかから選ばれる異った配位子である。残余のメンバーは通常その他の低分子配位子、接近標識又は巨大分子や固体支持体である。巨大分子の特異修飾の場合のようなターゲット標識態様を意図するならば、ガイドメンバーは低分子配位子又は指定の巨大分子上の単数もしくは複数のターゲット部位と選択的に結合できる化学的活性基のどちらかから選ばれる。反応性メンバーはガイドメンバーが結合した位置に接近して同じ巨大分子上の位置に永久結合することができる化学的活性基から選定される。第3三座体メンバーは通常標識、トレーサー又はリポーター基となるように選定されるが、それは低分子、低分子配位子、又は巨大分子あるいは典型的には巨大分子である固体支持体であってよい。

【0042】三座複合体は一般的に出発スペーサー基のまわりに各三座体メンバーが互いにスペーサー基上への付着結合により作りあげられる。スペーサー基を通じて

二官能共役体のメンバーを付着結合させるには当業者公知の多くの方法がある。例えば、米国特許第4, 134, 792号、米国特許第4, 238, 565号及びグリーン エヌ エム、コニーツニイ エル、トムス イー ジェー、バレンチンアール シー「アビジン中のサブユニット配列決定における二官能性ビオチン化合物の使用」バイオケミカル・ジャーナル 125 781-791 (1971)を参照。これらの方法は一般に複合化前に活性化されたり、されなかったりする2種の異なった有機化合物の反応基間の典型的な縮合、付加、置換反応を用いている。同様にしくは同等の方法が、例えば、特に後述の例4に示すように、選定されたスペーサー基へ三座体メンバーを付着結合させるのに用いられる。スペーサー基の化学的組成そのものはそれに付着結合させるそれぞれの三座体メンバーに適用される化学部位の性質にある程度左右される。また、出発スペーサー基として使用される有機物質の有用性にも依存する。炭素原子に加えて窒素、酸素、イオウ、リンなどのヘテロ原子がスペーサー基の中に使用される。スペーサー基は芳香族基も含まれるが、一般に脂肪族基である。炭素、窒素又は酸素がスペーサー基に取り込まれる典型的な二価鎖においては、これらの各原子はスペーサー基の長さを約1.2〜約1.5 Å増加すると考えることができる。スペーサー基を通じて三座体メンバーを互いに連結するのに用いられる精密な方法は臨界的なものではない。重要なことは三座体メンバーがその三座体の合成後に意図された最終用途において効果的に機能する能力を保持していることである。例えば、低分子配位子メンバーはそれの特異結合パートナーと結合する能力を保持していなければならない。この考え方はスペーサー基との連結用の化学的部位を正確に選定するのににも影響する。通常はその三座体メンバーの活性部位を例えば特異結合反応が生じ得るよう最大限露出することが望まれる。

#### 【0043】2. 所要スペーサー長の決定

各三座体メンバーを他の各三座体メンバーと連結するのに必要とされるスペーサー基の長さはその三座体が合成される前に決定されねばならない。例えば、3つの低分子配位子を使用する三座体がモジュレート検定用として意図された場合、第1及び第3三座体メンバー間の最小限スペーサー長は通常初期段階で決定されねばならない。この最小限スペーサー長はモジュレーションが行われなかった場合、第1及び第3三座体メンバーのそれぞれの特異結合パートナーとの同時結合が達成され得るような点で決められる。この点以下では同時結合はなんら生じない。2つのホモ二官能性共役体メンバーがそれぞれの特異結合パートナーと同時結合し得るのに必要な最小限スペーサー長を決定するには当業者公知の多数の方法がある。例えば、ラルソン ピーオー、モスパック ケー「酵素の親和性沈殿」エルシビエル/ノース

オランダ・バイオメディカル・プレス、98(2)、333-338(1979)及びグリーン エヌ エム、コニーツニイ エル、トムス イー ジェー、バレンチン アール シー「二価性ビオチン化合物のアビジン中のサブユニットの配列決定における使用」バイオケミカル・ジャーナル、125、781-791(1971)を参照。同じ方法は第1及び第3三座体メンバーが同じ形式の同時結合をするのに必要な最小限スペーサー長の決定に用いることができる。特に、一般に第1及び第3三座体メンバーのみを含有する種々のスペーサー長を有する一連の二官能性共役体類似体が合成され、次いで同時結合が最初に観察されるスペーサー長が決定される。

【0044】同時結合の発生はその同時結合反応によって発生する測定可能な信号の生成を通常検出する。最小限スペーサー長を決定する簡便な1つの方法は同時結合の測定として光散乱複合体を検出する標準ネフェロ分析又はタービジティ分析の方法を通じて行うことである。これらの方法は二官能共役体の各メンバーと結合する多価巨大分子を利用することが必要であり、散乱センターを形成するのに十分な長さの複合体の形成がその三座体の意図する最終用途でない場合でさえも有用である。特に、スペーサー長に関してのみ変る二官能共役体（同族体として知られている）が各メンバーについてそれぞれの多価特異結合パートナーと接触させられる。例えば、2つの共役体メンバーとしてビオチンとテオフィリンを有する二官能共役体は最小限スペーサー長を検出する研究に用いられる。ビオチンは生物学的に活性な脂環式環及び短い炭素原子数5の脂肪族末端を含有している。この場合スペーサー長は便宜上脂肪族末端をスペーサー中へ取り込んだ生物学的に活性な環構造から測定される。二官能共役体の同族体を調製しアビジン及び抗テオフィリン抗体に接触させる。次いでネフェロ分析測定によりもし存在すれば複合体の量を検出する。最小限スペーサー長は測定可能な信号が初めて観測される点である。最適最小限スペーサー長は通常結合鎖数本の長さである。複合体形成量は最小限スペーサー長の炭素原子数又はヘテロ原子数で数個内で平衡に達する。スペーサー長は一般にこの平衡に達する点近くを選ぶのが望ましい。

【0045】最適最小限スペーサー長は二官能共役体、アビジン、抗体の比率を変えても大きくは変らない。さらに、同じ最小限スペーサー長データは若干の変動は観察されるけれども、ハプテン-ビオチン二官能共役体の1つのメンバーとしてテオフィリン以外のハプテンを使用する場合にも一般に適用される。ビオチン以外の低分子配位子が二官能共役体メンバーの1つに組み入れられた場合、アビジンに比較してこれらの配位子に対する種々の特異結合パートナーのサイズや形状の大きな変動により若干大きい変動が予期される。従って、或る場合に

は最小限スペーサー長を最適化するため別の同族体研究が要求されよう。さもなければ、テオフィリン-ピオチン共役体又は同様な低分子二官能共役体の研究は立体障害態様の何個かの三座共役体を成功裡に合成する少なくとも出発点を確保するのに十分な最適最小限スペーサー長データを提供する。最小限スペーサー長を決定するのに用いる二官能共役体は、前述したように、公知の従来技術方法の何れかの1つで合成することができる。これに選ばれた方法はその合成しようとする化合物の一連の同族体の1つである化合物の挿入工程が含まれる。例えば、アルカンジアミン ( $\text{NH}_2 - (\text{CH}_2)_N - \text{NH}_2$ ) 級の化合物にはエタンジアミン ( $N=2$ )、プロパンジアミン ( $N=3$ )、ブタンジアミン ( $N=4$ )、ペンタンジアミン ( $N=5$ ) 以下が含まれる。合成工程にこれら同族体の1つを挿入することが含まれる場合、二官能共役体の2つのメンバーを連結するスペーサーの鎖長を変えるため他の同族体を容易に置換することができる。

【0046】例えば、2種の異ったテオフィリン-ピオチン二官能共役体をこの方法で調製することができる。説明の明解化のため、これら2種の二官能共役体をここでは二官能共役体I及び二官能共役体IIと呼ぶことにする。二官能共役体IIは二官能共役体Iではテオフィリン基に隣接して窒素原子が位置しているのに対しテオフィリン基に隣接して炭素原子が位置している点で二官能共役体Iと相違する。最初に、合成工程の第1段階としてテオフィリンの第一級アミン誘導体を市販の出発テオフィリン誘導体から調製する。他のハプテンの第一級アミン誘導体を調製するのに他の方法を用いることができる。二官能共役体Iを調製する場合、過剰量のジアミンを出発誘導体8-ブロモテオフィリンとともに還流する。これは一般に窒素気流下で、選定されたジアミン及び得られる生成物Iに応じて、2~72時間行われる。二官能共役体IIは出発テオフィリン誘導体としてテオフィリン-8-酪酸から調製されるが、所望の縮合反応を行う前に活性化が必要である。特に、カルボニルジイミダゾール (CDI) 及びN-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) が選定されたジアミンの挿入前に出発誘導体テオフィリン-8-酪酸のカルボキシル基を活性化するために使用される。活性化はテオフィリン-8-酪酸を無水ジメチルフォルムアミド (DMF) に溶解し、約70℃に加熱しながら順次CDIを添加する。通常約15分間反応温度を約70℃に保持する必要がある、その後冷却して室温までもどす。次にNHSを冷却反応混合物に添加し一晩中室温で攪拌する。その後過剰量のジアミンを活性化された反応混合物に添加する。この結果が生成物IIである。所望の第一級アミン誘導体を生成する反応の完了はそれぞれの反応混合物I又はIIを薄層クロマトグラフィー (TLC) によりシリカゲルを塗布したTLCガラス板及び紫外線指示計を用いて決定することが

できる。

【0047】次に反応混合物は小容量になるまで減圧下で蒸発させ、この濃縮反応混合物をこう配クロロホルム:メタノール混合液を用いる標準シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製せねばならない。精製テオフィリン第一級アミン誘導体を含有する溶出留分は一括して回転乾燥器中で蒸発乾固する。蒸発により得られた白黄色結晶固体はさらに精製することなく次の反応に使用する。テオフィリンのモノアミン誘導体はメタノール中295nmで約 $1.9 \times 10^3$ の分子吸光率を有している。ピオチン-テオフィリン共役体Iは、図2に模式的に示すように、反応混合物Iからのテオフィリンの第一級アミン誘導体を含有する結晶固体を無水DMF中に溶解し、活性化したカプロアミドピオチンのN-ヒドロキシスクシンイミドエステル (ピオチン-X-NHS) 中で攪拌する。他のハプテンの第一級アミン誘導体も同様にピオチン-X-NHS又は活性化カルボキシル基を含有する他の化学基を用いて縮合することができる。この溶液もまた室温で一晩中攪拌する。ピオチン-テオフィリン共役体IIは、図3に示すように、反応混合物IIからのテオフィリンの第一級アミン誘導体を含有する結晶固体をピオチンのN-ヒドロキシスクシンイミドエステル (ピオチン-NHS) で混合する以外は同様にして調製する。どちらの場合も、所望の生成物は通常DMFから白色綿状固体として分離する。生成物はろ紙上に集め、分取薄層クロマトグラフィー又はカラムクロマトグラフィーのどちらかによりTLC試験で単一スポットとなるまで精製する。

【0048】同様に最小限スペーサー長を決定するのに用いることができるその他の方法には酵素チャンネル及びエネルギー転移法がある。NIIA分析に用いられたのと同じ一連の二官能共役体の同族体が各第1及び第3メンバーに対するそれぞれの標識つき特異結合パートナーと接触させられる。これらの研究は遊離被検出体及びモジュレーターガ存在しないことを除いて典型的なモジュレート検定法と同じである。接近標識により発生される信号は標識巨大分子の同時結合を許容する最小限スペーサー長において観測され始める。最適最小限スペーサー長は最小限スペーサー長よりも若干長い。第1及び第3メンバーが特異結合パートナーを有さない場合、これらの2メンバー間の同時結合の必要がないから第1及び第3メンバー間のスペーサー長は臨界的なことではない。例えば、これらメンバーの1つが第2接近標識である場合、第1接近標識に複合した特異結合パートナーは第2接近標識 (三座体メンバー) の分子サイズが小さいことによりその対応する三座体メンバーに容易に結合することができる。第1及び第3三座体メンバーの1つが複数の第2接近標識と複合した高分子である場合、通常その標識特異結合パートナーがその対応する低分子配位子メンバーと結合できるようにするためある程度の

最小限スぺーサー長要求が存在するが、その最小限スぺーサー長は2つの特異結合パートナーが同時結合するのに要求されるのよりも短い。二官能共役体同族体の1つが意図巨大分子三座体メンバーであるような例において、同様な同族体研究を行うことができる。

【0049】2つの三座体メンバーを連結するスぺーサー基の区間は普通2つの二官能共役体メンバーを連結するスぺーサー基のように真直ないし剛直ではないことを指摘せねばならない。これは、一部、通常スぺーサーの中心点に位置する炭素原子の4つの結合の4面体空間配列によっている。図7参照。この理由により意図第1及び第3三座体メンバーを用いる二官能共役体が三座体の同じメンバーの同時結合作用を促進するために使用される場合に観察される最適最小限スぺーサー長に約10～20%程度スぺーサー長を増さねばならない。汎用三座体の2つの低分子配位子メンバー間の同時結合発生の最小限スぺーサー長を確定するために得られた同じデータは競争モジュレート免疫検定での使用を意図した三座体の第2三座体メンバーの相対位置の決定に用いることができる。第2メンバーとモジュレーションの所望される残余の三座体メンバーとを連結するスぺーサー基の区間は同時結合を許容する最小限スぺーサー長より短くしなければならない。三座体メンバーが全て低分子配位子である場合、第1及び第3三座体メンバー間の距離は第2（モジュレート）メンバーと第1及び／又は第3三座体メンバー（モジュレートされることが所望の残余メンバーに依る）間の距離よりも長くなるであろう。

【0050】ターゲット標識態様においては最小限スぺーサー長は意図標識とターゲット巨大分子の間で要求される。このメンバーが低分子配位子である場合、意図標識を反応性メンバーと連結するスぺーサー基の区間の長さは結合された意図標識が標識巨大分子からの立体障害を招くことなくそのとく結合パートナーと結合するのに十分な長さでなければならない。一般に2つの低分子配位子間又は低分子配位子と巨大分子間の同時結合に必要な最小限スぺーサー長を確定するのと同じデータをここに用いることができる。ただし結果を完全に最適化するために同族体を用いる若干の実験が必要になろう。ターゲット巨大分子のように第3三座体メンバーがまた巨大分子である場合、スぺーサー長は一般に臨界的なものではない。このことは本発明がターゲット共役を例えば酵素の活性部位が特異的に例えば固体支持体への共役部位から離れて位置するようにすることを可能ならしめるから真実である。

#### 【0051】3. 三座共役体の調製

3つの三座体メンバーは一般に当業者に公知の伝統的有機合成技術を用いて互いに複合することができる。しかしながら、本発明の三座体は三座体の機能的特質を制御するために注意深く選定されたスぺーサー基を取り込む必要がある。従って三座体の合成を出発スぺーサー基か

ら初めてそのまわりに残余の三座体を造りあげていくのが好ましいことが見出された。出発スぺーサー基の種々の部分は上述のように合成工程の間に延長されていく。出発スぺーサー基は適切かつ個々に誘導体化され得る3種の化学的官能基を有する有機分子であることが好ましい。さらに好ましくは3種の化学基は全て異なった官能基である。化学基の2つ以上が同じ官能基である場合、これらおなじ化学基の1つ以上は（1）他の同じ基が誘導体化されている間に保護され、（2）つづいて部分的に合成された三座体の残余の部分又は保護された官能基自体に対し化学的変性をもたらすことなく処理され得るべきである。適切に誘導体化され得る典型的な官能基にはアミノ基（ $-NH_2$ ）、カルボキシル基（ $-COOH$ ）及びメルカプト基（ $-SH$ ）が含まれる。アミノ基及びカルボキシル基は典型的な縮合反応において互いに反応し2つの分子を連結する。通常の場合カルボキシル基は縮合反応の前に活性化されねばならない。メルカプト基はマレイドイミジル基同様他のメルカプト基と反応して最終的に共有結合により2分子を互いに結合する。

【0052】出発スぺーサー基は合成分子であってもよいし、天然に見出される分子であってもよい。天然由来のアミノ酸は一般に三座体合成用の良好な出発スぺーサー基を備えている。天然由来のアミノ酸の殆ど全てが $\alpha$ -アミノ酸、すなわち、定義によれば、そのアミノ酸の $\alpha$ -炭素位置にアミノ基及びカルボキシル官能をともに含有している。これらのアミノ酸のいくつかはそのアミノ酸の $\omega$ -位置、すなわち、末端炭素に付加官能基を有している。例えば、リシンはその $\omega$ -位置に第2のアミノ基を有している。これに対し、グルタミン酸の $\omega$ -位置には第2のカルボキシル官能はない。システインなどのメルカプトアミノ酸は3つの異なった化学的官能基、すなわち、アミノ、カルボキシル及びメネカプト基を有しているから特に出発スぺーサー基用として適している。リシンもまた入手し易さ及び比較的廉価のため出発スぺーサー基用の好ましいアミノ酸である。その他の好ましいアミノ酸にはチロシン及びセリンなどのその他の天然由来アミノ酸とともにグルタミン酸が含まれる。

【0053】前述したように、リシン及びグルタミン酸にはともに2つの同じ官能基が含まれている。2つの同じ官能基を有するこれら及びその他の出発スぺーサー基の化学基個々に誘導体化するためには、これら官能基の一方は他方が誘導体化されている間に保護されていなければならない。カルボキシル官能用の保護基には、例えば、ベンジルエステル及び第三級ブチルエステル基が含まれる。アミノ基の保護が必要な場合には、例えば、カルボベンゾイルエステル、ベンゾイロキシカルボニルフラリル又は9-フルオレニルメチロキシカルボニルが用いられる。これら及びその他の官能の保護基は基本合成技術で公知である。保護基はその官能基又は三座体の残余を害することなく除去（すなわち保護解除）し得る

ものでなければならない。意図した三座体メンバーを出発スパーサー基に結合する順序は普通臨界的なものではない。これらの例において結合の順序は一般に便宜を考慮して考えられよう。しかし、三座体メンバーの1つが複数の接近標識に共役される固体支持体であるような例においては固体支持体メンバーは最後に付着結合すべきである。例えば、図11に示す三座体の合成において部分的に合成のすんだ三座体（テオフィリン及びDNP基をすでに結合）はイソルミノール接近標識と同時に固体支持体と共役させられる。三座体/接近標識の比率は反応媒質中に添加されるこれら化合物のそれぞれの量によって一般に制御することができる。

#### 【0054】

##### A. 出発スパーサー基としての環状酸無水物

環状酸無水物はこれら出発スパーサー基に三座体メンバーを付着結合するの一般に使用される2つのカルボキシル官能のうち1つが「自己保護」能力を有していることにより特に良好な出発スパーサー基を提供する。例えば、グルタミン酸の2つのカルボキシル官能基はピログルタミン酸の無水機能のようである。意図された第1メンバーの第一級アミノ基は、図4に示すように、ピログルタミン酸の無水機能と反応して共役化グルタミン酸となることができる。無水機能の1つのカルボキシル基のみが第一級アミノ基に加わり残りのカルボキシル基を遊離のカルボキシル官能として放出する。遊離のカルボキシル基は後にもう1つの意図されたメンバーの第一級アミノ基と縮合反応により別に誘導体化されることができる。縮合反応は第1メンバーの付着結合後直ちに行うか又は、例えば図4に示すように、第2三座体メンバーのグルタミン酸のアミノ官能への付着結合につづいて行うことができる。ピログルタミン酸のアミノ官能は遊離したカルボキシル官能とピログルタミン酸のアミノ基が重合するのを防止するためカルボベンゾキシ（CBZ）基などの保護基と好ましく複合する。通常無水官能の2つのカルボキシル基のうちどちらが第一級アミンと反応するかを制御するのは困難である。これは一般に、図4に第1三座体メンバーの添加につづいて示すように、2つの異った異性体が形成される結果となる。第1メンバーと残りの三座体メンバーを連結するスパーサー基の区画は1つの異性体との方他の方よりも1結合分長い。この逆が遊離したカルボキシル官能、この場合は第3三座体メンバーに結合する三座体メンバーについていえる。例えば、図4に示す完成した三座体において第1メンバーと第2メンバーを連結するスパーサー基の区画は1つの異性体の中で結合数7であり、他の異性体の中で結合数6である。この反対が第3メンバーと第2メンバーを連結するスパーサー基の区画に関してはいえ、すなわち、1つの異性体の中で結合数6の長さで、他方で結合数7の長さである。

【0055】もう1つの有用な環状無水化合物はSー

セチルーコハク酸無水物である。第一級アミノ基はSーアセチルーコハク酸無水物の酸無水物と反応することができ、それによって置換されたSー保護コハク酸が得られ意図される第1メンバーの第一級アミノ基が無水物のカルボキシル基の1つに加わる。図5参照。このことが残りのカルボキシル基を開放して遊離のカルボキシル基の形にし、これが残りの三座体メンバーの1つと比較的容易に結合することができる。保護解除につづいて、図5に示すように、メルカプト基がなおもう1つの三座体メンバーに付着結合されることができる。ピログルタミン酸、他の酸無水物の場合のように2つの異性体つき三座体が最終的に形成される。結果として、カルボキシル基を通じて付着結合した2つのメンバーのおのおのを連結するスパーサー基の区画は1結合分ごとと変っている。通常このようなスパーサー長の僅かな変化は三座体の性能に影響を与えない。ただ1つの特殊な異性体の使用が望まれる異常な場合、所望の異性体は初期段階で最初の付加反応につづいて標準的な分離工程で混合物から分離することができる。スパーサー基の種々の区画長さは2つの二官能共役体メンバーを連結するスパーサー長を変えることについて前に述べたのと同じ方法を用い容易に制御すなわち変更することができる。例えば、一連のジアミン同族体は第一級アミンが出発スパーサー基へ結合するのに必要な意図される三座体メンバーへスパーサー長を加えるのに特に有用である。スパーサー区画の長さの調整は通常出発スパーサー基へ結合する前に行われる。

#### 【0056】

B. 出発スパーサー基としてのカルボベンゾキシリシン  
2つの同じ官能基の1つの保護を必要とする出発スパーサー基の良好な例はリシンである。市販の $\omega$ -カルボベンゾキシリシン（ $\omega$ -CBZ-リシン）は種々の三座体合成用の良好な「事前保護」出発スパーサー基を提供する。カルボベンゾキシ保護基はリシン分子の $\omega$ -位置で第2アミノ官能へ結合され、 $\alpha$ -アミノ官能が誘導体化された後にはじめて除去される。意図された第1メンバーを $\omega$ -CBZ-リシンの $\alpha$ -アミノ基へ付着結合することは便利ではあるが、必要ではない。事前保護 $\omega$ -CBZ-リシンは本発明の立体障害態様を用いる三座体の合成並びにターゲット標識態様を用いる三座体の合成における出発スパーサー基として使用することができる。例えば、図1に示す前述のNIIAのようなテオフィリン競争モジュレート検定に有用な汎用ビオチン-テオフィリン-DNP三座体は $\omega$ -CBZ-リシンから簡便に合成することができる。この三座体の合成は図6に模式的に示す。

【0057】第1三座体メンバー、ビオチンは市販の活性化ビオチン、ビオチン-NHSを利用して $\omega$ -CBZ-リシン（スパーサー）の $\alpha$ -アミノ基へ結合することができる。（例えば、ビオチン-X-NHSは長いスベ

ーサーが必要とされる場合に使用することができる。)  $\omega$ -CBZ-リシンを先ず炭酸水素塩溶液中に溶解し、完全に溶解させるため沸騰加熱する。冷却して室温にもどしてからろ過し、ピオチン-NHS (活性化第1メンバー) を溶液に加え、図6に示すように、ここでピオチンの活性化カルボキシル基をリシンの $\alpha$ -アミノ基と縮合させる。次いで誘導されたピオチン- $\omega$ -CBZ-リシン (第1メンバー-スぺーサー) を標準ろ過方法により集める。ピオチン- $\omega$ -CBZ-リシンは通常第2メンバー結合処理を行う前にさらに精製する必要はない。第2三座体メンバー、テオフィリンを第一級アミンの形で誘導体化リシンの活性化 $\alpha$ -カルボキシル基へ付着結合させる。テオフィリンの付着結合は保護された $\omega$ -アミノ基の共役の前でも後でも行うことができる。テオフィリンの所望の第一級アミン誘導体は前述の二官能共役体I合成の第1段階で示したように8-ブロモテオフィリンから調製することができる。テオフィリンを他の2つの三座体メンバーと連結するスぺーサー基の区画はテオフィリンの第一級アミン誘導体の調製に使用するジアミンそのものの選定により制御することができる。例えば、エチレンジアミンをテオフィリン-エチレンジアミンの調製に使用することができる。このようにして調製されたテオフィリンの所望の第一級アミン誘導体は出発スぺーサー基との複合体調製のため無水DMFに溶解する。

【0058】 リシンスぺーサーの $\alpha$ -アミノ基の誘導体化から得られたピオチン- $\omega$ -CBZ-リシン (第1メンバー-スぺーサー) の固体は無水DMFに溶解し、約70℃に加熱してリシンスぺーサーの $\alpha$ -カルボキシル基をCDIの添加により活性化する。冷却して室温に戻した後、予め溶解させたテオフィリンの選定第一級アミン誘導体 (第2メンバー)、すなわち、テオフィリン-エチレンジアミンを溶液中へ添加する。リシンスぺーサーの活性化された $\alpha$ -カルボキシル基は、図6に示すように、テオフィリンの第一級アミン誘導体と容易に縮合しピオチン-テオフィリン- $\omega$ -CBZ-リシン誘導体 (第1メンバー-第2メンバー-スぺーサー) を含有する沈殿物を形成する。次いでこの沈殿物を集め乾燥したものをこう配クロロホルム:メタノール混合液を用いるシリカゲルカラム上での分離クロマトグラフィーにかけることによりピオチン-テオフィリン- $\omega$ -CBZ-リシン共役体の精製を行うことができる。カルボベンゾキシ保護基は二度誘導体化されたリシンスぺーサーの $\omega$ -アミノ基から除去して $\omega$ -アミノ基が第3メンバーと複合できるようにしなければならない。カルボベンゾキシ保護基の除去は多くの方法で行うことができる。1つの簡便な方法は単離したピオチン-テオフィリン- $\omega$ -CBZ-リシン

(第1メンバー-第2メンバー-スぺーサー) を市販の臭化水素酸の酢酸30% (重量%, 比重1.262) 混合液中に溶解することである。次に酸混合液を脱イオン水で希釈した後固体炭酸水素ナトリウムを用い中和す

る。このように保護解除されたピオチン-テオフィリン- $\omega$ -CBZ-リシン複合体 (第1メンバー-第2メンバー-スぺーサー) の $\omega$ -アミノ基は意図された第3メンバーの末端の活性化カルボキシル基を使用して誘導体化することができる。

【0059】 末端カルボキシル基は意図された第3メンバー、DNPと、ビス- $\alpha$ -アミノカブロン酸を2,4-ジニトロフルオロベンゼン (サンガー試薬として知られるDNP前駆物質) と反応させてDNP-ビス- $\alpha$ -アミノカブロン酸を形成させることにより付着結合させることができる。この反応は室温において約2時間で完了する。図6に示すように、ビス- $\alpha$ -アミノカブロン酸はDNPと他の三座体メンバーとを連結するスぺーサー基の共通区画に14個の原子を与えている。スぺーサーのこの区画の長さはビス- $\alpha$ -アミノカブロン酸以外の代りの $\omega$ -アミノ酸を用いることによって容易に制御できる。例えば、5-アミノペンタノン酸を6-アミノカブロン酸と縮合させて原子数13のスぺーサー挿入部を形成させることができる。DNP-ビス- $\alpha$ -アミノカブロン酸 (第3メンバー-スぺーサー挿入部) は単離し、反応混合物を蒸発乾燥により精製し、残留物を脱イオン水に溶解し、その溶液を塩酸で酸性にした後エチル酢酸を用い抽出してDNP-ビス- $\alpha$ -アミノカブロン酸 (第3メンバー-スぺーサー挿入部) とすることができる。次にエチル酢酸を除去し、標準シリカゲルカラムクロマトグラフィー法を用いDNP-ビス- $\alpha$ -アミノカブロン酸をさらに精製することができる。CDI及びNHSは酸の反応性NHSエステルを形成させることによりDNP-ビス- $\alpha$ -アミノカブロン酸 (第3メンバー-スぺーサー挿入部) の末端カルボキシル基を活性化するのに使用する。この反応は無水クロロホルム中で比較的急速に行われる。クロロホルム溶液は乾燥近くまで蒸発させた後容積を無水DMFでもとに戻し、これを予め別に調製した保護解除ピオチン-テオフィリン-リシン (第1メンバー-第2メンバー-スぺーサー) を含有する溶液に添加する。リシンスぺーサー基の露出 $\omega$ -アミノ基とDNP-ビス- $\alpha$ -アミノカブロン酸の活性化カルボキシル基 (活性化第3メンバー-スぺーサー挿入部) との間の縮合反応は全く容易に行われ、ピオチン-テオフィリン-DNP三座体 (第1メンバー-第2メンバー-第3メンバー) の第3メンバー結合が得られる。

【0060】 同じ市販の事前保護 $\omega$ -CBZ-リシンもまた本発明のターゲット標識態様に用いる三座体用の出発スぺーサー基として使用することができる。例えば、フェニルボロン酸-ニトロフェニルアジド-ピオチン複合体の合成を図8に示す。ピオチン-テオフィリン-DNP三座体合成の場合のように、カルボベンゾキシ保護基はCBZ-リシンの $\alpha$ -アミノ官能が誘導された後初めて除去される。反応性アジド基は、図8に示したように、3-ニトロ-4-フルオロフェニルアジドをCBZ

ーリシンの $\alpha$ -アミノ基と反応させることによって最初にCBZ-リシンに結合させる。アジド基は容易にCBZ-リシンスペーサーに結合してアジド-CBZ-リシン(反応性メンバー-スペーサー)が生成される。誘導CBZ-リシンの $\alpha$ -カルボキシル官能は一般にCDI及びNHSを用い $\alpha$ -カルボキシル位置でさらに誘導が行われる前に活性化される。共役体化に利用できる第一級アミンを有するボロン酸基(ガイドメンバー)を次に標準縮合反応により誘導アジド-CBZ-リシンの活性化 $\alpha$ -カルボキシル官能結合することができる。図8参照。

【0061】第3の三座体メンバーはカルボベンゾキシ保護基が除去された後に初めて二度誘導体化されたボロン酸-アジド-CBZ-リシン(ガイドメンバー-反応性メンバー-スペーサー)に付着結合される。これは前述のようにボロン酸-アジド-CBZ-リシン(ガイドメンバー-反応性メンバー-スペーサー)を市販の臭化水素酸の酢酸30%(重量%、比重1.262)混合液中に溶解することによって行うことができる。この酸混合液を脱イオン水で希釈した後固体炭酸水素ナトリウムを用い中和する。このように保護解除されたボロン酸-アジド-リシン複合体(ガイドメンバー-反応性メンバー-スペーサー)の $\omega$ -アミノ基は意図された第3メンバーの末端の活性化カルボキシル基を使用して誘導体化することができる。ビオチンが意図された第3メンバーである場合、市販のビオチン-NHS(スペーサーに5原子添加)又はビオチン-X-NHS(スペーサーに12原子添加)を用いることができる。代わりにビス-カプロアミドビオチン(ビオチン-X-X-NHS)がスペーサーに12個の原子の添加が望まれる場合に簡便に使用することができる。これら全ての「事前活性化」ビオチン誘導体はリシン出発スペーサー基の $\omega$ -アミノ基と容易に縮合し、所望のボロン酸-アジド-ビオチン(ガイドメンバー-反応性メンバー-意図された標識)三座共役体が得られる。図9に示す三座共役体はビオチン-X-X-NHSを最終誘導体化段階で使用して得られたものである。

#### 【0062】C. その他の三座体

本発明のその他の三座体はなおCBZ-リシン、環状酸アジド無水物、又はその他の適切な出発スペーサー基を用いて合成することができる。例えば、図10に示す本発明の立体障害態様を用いる第1又は第3三座体メンバーの1つが接近標識であるエネルギー転移検定用三座体は容易に合成することができる。種々のエネルギー供与

体接近標識は三座体メンバーとして簡単に結合させることができる。これらおよびその他の三座共役体の作り方は上記の説明に照らして当業者には明白であろう。

#### 【0063】

##### 【実施例】

##### 例1

##### 二官能共役体Iの合成

スペーサー中へ挿入する変数としてヘキサンジアミン(N=6)を用いる二官能共役体Iの合成を図2に模式的に示す。二官能共役体のN=6同族体は下記の方法で調製した。過剰量のヘキサンジアミン( $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_6-\text{NH}_2$ )を8-プロモテオフィリンとともに窒素気流下で24時間還流した。還流反応終点は反応混合物をTLC分析でシリカゲルを塗布したガラスTLC板及び紫外線指示器を用いて決定した。反応混合物は次いで減圧下で小容積になるまで蒸発させた。濃縮反応混合物を少量のシリカゲルと混合し、熱板上で乾燥し、次いでそのシリカゲル-試料混合物を開始溶離剤としてのクロロホルムを用いて注意深くシリカゲルカラムの頂部に載せた。カラムはメタノールの量を変えたクロロホルムを含有する溶媒で溶出処理した。こう配組成がクロロホルム中メタノール20%に達した時カラムをメタノール20%、アンモニア4%、クロロホルム76%を含有する混合液で溶出処理した。純粋なN-(8-テオフィリン)-6-アミノヘキサミンを含有する留分は一括して回転蒸発器中で蒸発乾固した。白黄色の結晶固体はさらに精製することなく次の反応に使用した。等モル量のN-(8-テオフィリン)-6-アミノヘキサミンを無水DMFに溶解し、次いで対応するモル量のビオチン-X-NHSと混合し室温で24時間攪拌放置した。所望の生成物をDMFから白色の綿状固体として分離し、ろ紙上に集め、カラムクロマトグラフィーよりTLC試験で単一スポットとなるまで精製した。スペーサー基鎖長は二座体の合成に用いるジアミン( $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_N-\text{NH}_2$ )を選定することにより制御される。例えば、最初の合成段階でヘキサンジアミンを選定した場合は、図2に示すように、6個の炭素原子がスペーサー基鎖長に寄与する。この場合スペーサー基の近似的な長さは26.0Åである。二官能共役体Iのスペーサー中へ種々のジアミンをN=6同族体の調製に用いたのと同じ操作を用い挿入することにより得られた鎖長を表1に示す。

#### 【0064】

##### 【表1】

表1  
二官能複合体 I 同族体のスぺーサー基の長さ

ジアミン	スぺーサー中の全原子数	近似スぺーサー長 (Å)
N = 2	16	21.0
N = 3	17	22.2
N = 4	18	23.5
N = 5	19	24.8
N = 6	20	26.0
N = 7	21	27.3
N = 8	22	28.5

#### 【0065】例2

##### 最小限スぺーサー長の測定

最小限スぺーサー長を抗テオフィリン抗体及びアビジンの存在下で表1に示した各共役体により発生される信号の量(レート)を検出することにより測定した。この測定の目的は二官能共役体、抗体及びアビジンの化学量論的比率における最適結合のための最小限スぺーサー長を単に求めることにあった。試薬は次のようにして調製した。テオフィリンに対するモノクローナル抗体をICS(商標)希釈液(ベックマン・インスツルメンツ、商標ICS試薬)中に1:13.3に希釈した。ボーリンガーマンハイムから購入したアビジンをICS希釈液中に0.13mg/mlの濃度になるよう溶解した。表1に示した各二座共役体を種々の希釈率でpH5.5の0.1モルリン酸緩衝液に溶解した。ネフェロ分析測定はICS(商標)ネフェロメーター(ベックマン・インスツルメンツ)にICS(商標)ガラスびん(ベックマン・インスツルメンツ)に入れた600μlのICS緩衝液(ベックマン・インスツルメンツ、商標ICS試薬)を置き、抗体溶液42μl及びアビジン溶液42μlを注入した。一時的な注入がおさまリ、基線が得られた後、42μlの二座共役体を添加し計器のピークレート信号記録を開始させた。

【0066】N=2からN=8までの結果を図12に示す。図12において、水平軸の単位は295nmでの吸光度に基く二座体濃度を表わす。垂直軸の単位はICS(商標)マニュアルモードカードM33(ベックマン・インスツルメンツ)を用いて得たICS(商標)レートユニットである。約2000ユニット以上の高レート信号の場合はICS(商標)ローゲインカードを用い、その結果はM33ゲインに換算した。図12の結果からわかるように、テオフィリン環炭素とビオチンの脂環炭素の間に17結合(16原子)を有する二官能共役体Iの最低級同族体(N=2)は測定可能な複合体形成を得るに至らなかった。その次の級の同族体(二座共役体I、N=3)から測定可能な複合体形成を示し始めた。それより高級な同族体(N=4からN=8)は相当した高さ

の信号を発し、N=8で天井に達した。この研究はテオフィリンを第1二座体メンバーとして用い、ビオチンを第2二座体メンバーとして用いた場合、信号を生成するためには約22.2Åの最小限スぺーサー長が必要であることを示している。最適としては、スぺーサー長は少なくとも約23.5Å(二官能共役体I、N=4)、より好ましくは約26.0から約28.5Å(二官能共役体I、N=6からN=8、すなわち、スぺーサー中の原子数20から22)である。

#### 【0067】例4

##### 二官能共役体IIの合成

二官能共役体Iで得られた結果を確認し、別の合成法を実証するため第2の二官能共役体を調製した。スぺーサー中へ挿入する変数としてヘキサンジアミンを用いる二官能共役体IIの合成を図5に模式的に示す。二官能共役体IIのN=6同族体は下記の方法で調製した。テオフィリン-8-酪酸を無水DMFに溶解し、約70℃に約15分間保持し、次いで室温に冷却するまで放置した。冷却した反応混合物に等モル量のNESを添加し、室温で一晩中攪拌放置した。反応混合物に約3~6モル過剰のヘキサンジアミン( $H_2N-(CH_2)_6-NH_2$ )を添加した。反応の完了は反応混合物をTLC分析でシリカゲルを塗布したガラスTLC板及び紫外線指示器を用いて決定した。反応混合物は次いで減圧下で小容積になるまで蒸発させた。濃縮反応混合物を少量のシリカゲルと混合し、熱板上で乾燥し、次いでそのシリカゲル試料混合物を開始溶離剤としてのシロロホルムを用いて注意深くシリカゲルカラムの頂部に載せた。カラムはメタノールの量を変えたクロロホルムを含有する溶媒で溶出処理した。この配組成がクロロホルム中メタノール20%に達した時カラムをメタノール20%、アンモニア4%、クロロホルム76%を含有する混合液で溶出処理した。純粋な6-(8'-テオフィリン酪酸-カルボキサミド)-ヘキシルアミンを含有する留分は一括して回転蒸発器中で蒸発乾固した。白黄色の結晶固体はさらに精製することなく次の反応に使用した。等モル量の6-(8'-テオフィリン酪酸-カルボキサミド)-ヘキシ



ルアミンを無水DMFに溶解し、次いで対応するモル量のピオチン-NHSと混合し室温で24時間攪拌放置した。所望の生成物をDMFから白色の綿状固体として分離し、ろ紙上に集め、カラムクロマトグラフィーよりTLC試験で単一スポットとなるまで精製した。二官能共

役体IIのN=5の同族体をヘキサレンジアミンの代りにペンタンジアミンを用いた以外同じ操作により調製した。これら2種の同族体のスペーサー長は表2に示す。

【0068】

【表2】

表2  
二官能共役体II同族体のスペーサー基の長さ

ジアミン	スペース中の全原子数	近似スペーサー長 (Å)
N = 5	16	21.0
N = 6	18	22.0

【0069】二官能共役体IのN=2同族体は二官能共役体IIのN=5同族体と同等である(21.0 Å)。二官能共役体I及びIIのそれぞれN=3及びN=6同族体もまた同等である(22.2 Å)。第2シリーズのN=5同族体は第1シリーズのN=2同族体同様測定し得る複合体形成を作ることができなかった。しかしながら、二官能共役体IIのN=6同族体及び二官能共役体IのN=3同族体からは対比し得る信号が得られた。このことはテオフィリンとピオチン又は同様のハブテン及び/又は低分子が第1及び第3三座体メンバーとして選定された場合、第1及び第3三座体メンバーのそれぞれの特異結合パートナーとの同時結合が達成されるためには少なくとも22.2 Åのスペーサー基が必要とされることを確認している。

#### 【0070】例4

##### ピオチン-テオフィリン-DNP三座体の合成

テオフィリンの競争モジュレート免疫検定に使用するピオチン-テオフィリン-DNP三座体を出発スペーサー基としてCBZ-リシンを用い合成した。ピオチン-テオフィリン二官能共役体I同族体研究から得た最適最小限スペーサー長データをピオチン-テオフィリン-DNP三座体を設計する出発点として使用した。特に、約26.0から28.5 Å、すなわち、スペーサー中20から22原子数の最適最小限スペーサー長を二官能共役体のピオチンとテオフィリンメンバーの同時結合用として認定した。(例2参照)。その10~20%増、すなわち、約22から26原子数がモジュレーションが存在しない場合の三座体のピオチン及びDNP(第1及び第3)メンバーの同時結合を得るのに最適であると考えた。ピオチンをモジュレートされるメンバーに選定し、ピオチンとテオフィリン(モジュレートメンバー)を連結するスペーサー基の区画を12原子数というかなり短いスペーサー長に選んだ。

#### 【0071】第1三座体メンバーの結合

出発スペーサー基、 $\omega$ -カルボベンゾキシ-リシン(CBZ-リシン)を炭酸水素塩溶液中に添加し、完全に溶解させるため沸騰加熱した後冷却して室温にもどした。冷却溶液を溝つきろ紙を用いる過した。意図する第1メ

ンバーピオチンを含有する等モル量のピオチン-NHSを溶液に加え、室温で約24時間攪拌した。白色固体のピオチン-リシンが形成されたが、これを標準ろ過方法により集めた。このピオチン-リシンの粗生成物はその後の精製段階に付すことなく次の三座体調製段階に使用した。

#### 【0072】第2三座体メンバーの結合

ピオチン-リシンを無水DMFに溶解し、その混合物を約70℃に加熱し、CDIの添加によってリシンのカルボキシル基を活性化した。活性化工程を約15分間行ってから冷却して室温に戻した。冷却した混合物は室温で約30分間さらに攪拌した。等モル量のテオフィリン-エチレンジアミンを先ずDMFに溶解した後冷却溶液に添加し、これを室温で一晩攪拌放置した。ピオチン-テオフィリン-CBZ-リシンを含有する白色沈殿が一晩で形成され、これを標準ろ過方法で集め、乾燥した。沈殿物は比較的少量の未反応不純物を含有したがこれをこう配クロロホルム:メタノール混合液を使用してシリカゲルカラム上で分離した。沈殿物は少量のシリカゲルと混合し、これを出発溶出液としてのクロロホルムを用い注意深くシリカゲルカラムの頂部に載せた。カラムはメタノールの比率を変えながらクロロホルム溶媒でこう配組成がクロロホルム中メタノール20%となるまで溶出した。カラムから溶出した最初の化合物はピオチン-テオフィリン-CBZ-リシンであったが、これを集めて蒸発乾固により白色粉末結晶を得た。この白色粉末結晶の紫外線吸収及びTLC分析により生成物がピオチン基及びテオフィリン基の両方を含有していることを確認した。

#### 【0073】第3三座体メンバーの結合

第3三座体メンバーを結合させるためには次の3段階が必要であった。(1)リシン基の第3メンバー位置の $\omega$ -アミノ基をCBZ基の除去によって保護解除しなければならない、(2)カルボキシル基を意図される第3メンバーの端部に結合させなければならない、(3)結合したカルボキシル基をリシン基の第3メンバー位置の遊離アミノ基と反応させるために活性化せねばならない。カルボベンゾキシ保護基のリシン基の $\omega$ -アミノ基からの除

去は白色粉末結晶を市販の臭化水素酸の酢酸30%（重量%、比重1.262）混合液中に溶解することにより行った。この酸混合液は脱イオン水でもとの容量の約50倍に希釈した後固体炭酸水素ナトリウムを用いて溶液pHが約8~9になるまで中和した。この中和溶液は意図される第3メンバーを結合用に調製する間隔に置いておいた。末端カルボキシル基を意図された第3三座体メンバー（DNP）にビス-アミノカプロン酸の2, 4-ジニトロフルオロベンゼン（サンガー試薬）との反応によって結合させた。特に、過剰量の2, 4-ジニトロフルオロベンゼンを予め炭酸水素ナトリウムの1M溶液に溶解させておいたビス-アミノカプロン酸に添加し、室温において約2時間反応させた。反応混合物を回転乾燥機中減圧下で蒸発乾固した。残留物を脱イオン水に溶解し、28%（重量%）塩酸を用いpH約1に酸性化した。DNP-ビス-アミノカプロン酸を含有する黄色沈殿物が形成され、これをエチル酢酸で抽出し、次にエチル酢酸を回転蒸発器で除去し、黄色固体を得た。この固体は上述のビオチン-テオフィリン-CBZ-リシン精製と同じ標準シリカゲルカラムクロマトグラフィー法を用いさらに精製した。

【0074】ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）及びNHSをDNP-ビス-アミノカプロン酸の末端カルボキシル基を酸の反応性エステルを形成させることによって活性化した。精製したDNP-ビス-アミノカプロン酸をまず無水クロロホルムに溶解し、これにNHSを徐々に添加した。DNP-ビス-アミノカプロン酸のNHSエステルが約60分以内に迅速に形成された。TLC分析はこれが純粋なエステルであることを示したが、それにもかかわらず、結晶化は困難であった。従って、溶液を乾燥近くまで蒸発させた後容積を無水DMFでもとに戻した。DNP-ビス-アミノカプロン酸の活性化NHSエステルを含有するDMF溶液を予め別に調製した保護解除ビオチン-テオフィリン-リシンを含有する溶液に添加した。リシンスペーサー基の露出ω-アミノ基とDNP-ビス-アミノカプロン酸の活性化カルボキシル基との間の縮合反応は室温で全く容易に生じ、三座体への第3メンバーの結合が得られた。完成した三座体の構造を図7に示す。

#### 【0075】例5

テオフィリン-アミン用NIIAの二座複合体

テオフィリン-アミン用NIIA形式の検定は例4からのビオチン-テオフィリン-DNP三座体を用いて成功裡に運転された。標準化した溶液からのテオフィリン-アミンを所定量の抗テオフィリン抗体について第2三座体メンバーと競争させた。テオフィリン-アミンの濃度増加はモジュレーションの減少及びネフェロ分析信号の増加を招いた。同じ三座体及び検定条件がテオフィリンについても使用することができる。試薬は次のようにして調製した。テオフィリンに対するモノクロナール抗体をICS（商標）希釈液（ベックマン・インスツルメンツ、商標ICS試薬）中に1:20に希釈した。マイルスラトリーズから購入した兔の抗-DNP抗血清を使用前にICS希釈液中で透析した。ボーリンガーマンハイムから購入したアビジンをICS希釈液に0.25 mg/mlの濃度になるよう溶解した。三座共役体をICS希釈液に $2.06 \times 10^{-8}$ モル/mlの濃度になるよう溶解した。テオフィリン-アミンをICS希釈液に $2.8 \times 10^{-8}$ モル/mlの濃度になるよう希釈した。同様溶液を最終濃度がそれぞれ $1.4 \times 10^{-8}$ 及び $0.56 \times 10^{-8}$ モル/mlの濃度になるように調製した。

【0076】モノクロナール抗テオフィリン抗体溶液138 µlを試験管に入れ、次いでこれに $2.8 \times 10^{-8}$ モル/mlのテオフィリン-アミン18.4 µlを添加した。得られた混合液を室温で2分間攪拌した。次に三座共役体溶液30 µlを試験管に加え、混合後約2分間放置した。ネフェロ分析測定はICS（商標）ネフェロメーター（ベックマン・インスツルメンツ）にICS（商標）ガラスびん（ベックマン・インスツルメンツ）に入れた600 µlのICS緩衝液（ベックマン・インスツルメンツ、商標ICS試薬）を置き、上記混合液31 µl及び抗DNP抗血清50 µlを注入した。マニュアルモードM33の装置ゲイン設定を用いた。一時的な注入がおさまリ、基線が得られた後、10 µlのアビジン溶液を添加し計器のピークレート信号記録を開始させた。次に $1.4 \times 10^{-8}$ 及び $0.56 \times 10^{-8}$ モル/mlのテオフィリン-アミン溶液18.4 µl及びICS希釈液18.4 µl（ゼロ点試験）を用い同じ操作を繰り返した。結果を表3に示す。

#### 【0077】

【表3】

表3

テオフィリン-アミン濃度 (モル/ml)				レートユニット
			0	1 5 8
			0	1 7 1
			0	1 6 5
0. 5 6	×	$10^{-6}$		2 4 0
0. 5 6	×	$10^{-8}$		2 6 5
0. 5 6	×	$10^{-8}$		2 1 8
1. 4 0	×	$10^{-8}$		3 6 5
1. 4 0	×	$10^{-8}$		3 8 9
1. 4 0	×	$10^{-8}$		3 6 1
2. 8 0	×	$10^{-8}$		6 4 8
2. 8 0	×	$10^{-8}$		6 3 8
2. 8 0	×	$10^{-8}$		6 1 0

## 【0078】例6

## 汎用三座体を用いる酵素チャンネル法

同じピオチン-テオフィリン-DNP三座体を競争モジュレート酵素チャンネル検定を行うのに使用することができる。例えば、ヘキソキナーゼなどの第一酵素をアビジン又は抗DNP抗体のどちらかに付着結合させる。G6PDHなどの第二酵素を他の特異結合パートナーに付着結合させる。試験試料に由来するか校正標準のテオフィリン又はテオフィリン-アミンが抗テオフィリン抗体を三座体の第2（モジュレート）メンバーからそらせることによって酵素のチャンネルをモジュレートする。

## 【0079】HK-アビジン共役体の調製

ヘキソキナーゼのチオール化をHK酵素をDMF 20% (v/v) 含有 pH 7.5 の 0.1 モルのリン酸塩緩衝液中に懸濁し、この懸濁液をS-アセチルメルカプトコハク酸無水物と温置することによって行う。反応が完了するまで放置した後、混合物を pH 7.5 の 1.0 モルヒドロキシルアミンで処理することによってヘキソキナーゼのチオール基を保護解除する。チオール化ヘキソキナーゼはこの混合物をセファレックス（商標）G-50（ビーズ状架橋デキストラン、スエーデンウプサラのファーマシア製）カラムを通すか標準透析法によって単離することができる。アビジンもまたDMF 20% (v/v) 含有 pH 7.5 の 0.1 モルのリン酸塩緩衝液中に懸濁し、次いでメターマレイイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミド（MBS-NHS）で処理する。反

応混合物を次にセファレックス（商標）G-50カラムに通してMBS標識アビジンを単離することができる。次に、等モル量のチオール化ヘキソキナーゼ及びMBS標識アビジンを温置することによってHK-アビジン複合体を得る。

## 【0080】G6PDH-抗DNP抗体の調製

G6PDH-標識抗DNP抗体はアビジン-HK複合体の場合と殆ど同じ方法によって調製する。酵素は最初にDMF 20% (v/v) 含有 pH 7.5 の 0.1 モルのリン酸塩緩衝液中に懸濁し、この懸濁液をS-アセチルメルカプトコハク酸無水物と温置することによってチオール化する。反応が完了するまで放置した後、混合物を pH 7.5 の 1.0 モルヒドロキシルアミンで処理することによってG6PDHのチオール基を保護解除する。チオール化G6PDHはこの混合物をセファレックス（商標）G-50カラムを通すか標準透析法によって単離することができる。抗DNP抗体もまたDMF 20% (v/v) 含有 pH 7.5 の 0.1 モルのリン酸塩緩衝液中に懸濁し、次いでMBS-NHSで処理する。反応混合物を次にセファレックス（商標）G-50カラムに通してMBS標識抗DNP抗体を単離することができる。次に、等モル量のチオール化G6PDH及びMBS標識G6PDHを温置することによってG6PDH-アビジン複合体を得る。

## 【0081】酵素チャンネル法用最適試薬濃度の決定

通常、信号生成の最適試薬濃度を決定することが望まれ

る。これは（１）モジュレーションがない場合最大限信号が、（２）高価な試薬の最小限使用量でえられる点である。次の試薬を使用する。

温置緩衝液：５０ミリモル・ピシン、pH 8.4、１００ミリモル・KCl、０.２％牛血清アルブミン（BSA）、０.０５％アジ化ナトリウム

三座体溶液：約１μg/ml テオフィリン当量濃度の三座共役体の温置緩衝液溶液

接近標識溶液：等モル量のHK-アビジンとG6PDH-抗DNP抗体の温置緩衝液懸濁液、種々の濃度で調製  
抗体溶液：抗テオフィリン抗体の温置緩衝液懸濁液、種々の濃度で調製

基質混合液：５０ミリモル・ピシン、pH 8.4、１００ミリモル・KCl、６ミリモル・MgCl<sub>2</sub>、３ミリモル・ATP、３ミリモル・NAD<sup>+</sup>、４０ミリモル・グルコース、４０％グリセロール

【００８２】初めに１００μlの三座体溶液と１００μlの接近標識溶液を８００μlの基質混合液中に添加する。NADH生成のレート（速度）は溶液中へ逸出する前にG6PDHによって作用されたHKにより発生するグルコース-6-リン酸塩の量の測定値、すなわち、酵素チャンネル化のレートである。この反応は４５０nmの検出波長及び３４０nmの励起波長設定の適切な蛍光光度計を使用して測定することができる。測定は接近標識溶液の希釈度を高めながらNADH生成レートが減少し始めるまで繰り返す。これにより最大限の信号発生に必要な接近標識溶液の最小限濃度が確定される。接近標識溶液の最小限濃度が設定された後に、最大限の立体障害が生じるのに必要な抗テオフィリン抗体の最適量が決定される。この決定を行うために１００μlの三座体溶液を１００μlの抗体溶液に混合し、約５～１５分間温置する。（抗原：抗体反応の安定状態の平衡は抗原、抗体のどちらかが固体表面に結合する系の場合とは対称的に非常に早く到達する。）次に、１００μlの最適化した接近標識溶液を加え、全体の反応混合液をさらに５～１５分間温置する。７００μlの基質溶液を最終的に加え、NADH生成レートを上述した蛍光光度計を使用して監視する。この検定は抗体溶液の濃度を高め（希釈度を低め）ながらNADH生成レートが最小限値、すなわち、抗体溶液の濃度を高めてもレートが下がらなくなるまで繰り返す。これが最大限の立体障害を生じるのに必要な抗体溶液の最小限濃度である。

#### 【００８３】被検出体の検定

はじめに１００μlアリコートの患者の試験試料を１００μlアリコートの三座体溶液と混合する。次にこの混合液を１００μlの最適化抗体溶液とともに約５～１５分間温置する。つぎにこの温置溶液に１００μlアリコートの最適化接近標識溶液を加え、その混合液をさらに５～１５分間温置する。その時点で、６００μlの基質溶液を加えてNADH形成レートを適当な蛍光光度計を使

用して監視する。次に、同じ操作を種々の希釈度のテオフィリン又はテオフィリン-アミン溶液について繰り返し、それらから標準曲線を得る。標準曲線からテオフィリン又はテオフィリン-アミンの濃度を内挿することができる。

#### 【００８４】例 7

##### 汎用三座体を使用するエネルギー転移法

同じピオチン-テオフィリン-DNP三座体を競争モジュレート化エネルギー転移検定に使用することができる。例えば、化学発光分子イソルミノールなどのエネルギー供与体をアビジン又は抗DNP抗体に付着結合させる。フルオレセインイソチオシアネートなどのエネルギー受容体を他の特異結合パートナーに付着結合させる。試験試料由来又は校正標準の遊離テオフィリン又はテオフィリン-アミンが抗テオフィリン抗体を三座体の第２（モジュレート）メンバーからそらせておくことによりエネルギー転移をモジュレートする。

#### 【００８５】イソルミノール-アビジン三座体の調製

過剰量のアミノブチルエチルアミノイソルミナルのイソチオシアネート誘導体をDMFに溶解する。次にアビジンをpH 9.5の0.1モル炭酸ナトリウム/炭酸水素ナトリウム緩衝液に懸濁させてアビジン溶液を作成する。次にイソルミナル含有DMF溶液をアビジン溶液に添加して約４℃で約１２時間温置する。その後過剰のイソルミナル標識を示量透析により除去し、次いでセファレックス（商標）G-50カラムを用いるゲルろ過処理する。

#### 【００８６】

##### フルオレセイン-抗DNP抗体三座体の調製

フルオレセイン-標識つき抗体は同様な方法で調製することができる。過剰量のフルオレセインイソチオシアネートをp-ジオキサンに溶解する。次に兎の抗DNP抗体をpH 9.5の0.1モル炭酸ナトリウム/炭酸水素ナトリウム緩衝液に懸濁させて抗体溶液を作成する。次にフルオレセイン含有p-ジオキサン溶液を抗体溶液に添加して約４℃で約１２時間温置する。その後過剰のフルオレセイン標識を示量透析により除去し、次いでセファレックス（商標）G-50カラムを用いるゲルろ過処理する。

#### 【００８７】エネルギー転移法用最適試薬濃度の決定

次の試薬を使用する。

温置緩衝液：５０ミリモル・リン酸塩緩衝液、pH 7.4

三座体溶液：約１μg/ml テオフィリン当量濃度の三座共役体の温置緩衝液溶液

接近標識溶液：等モル量のイソルミノール-アビジンとフルオレセイン-抗DNP抗体の温置緩衝液懸濁液、種々の濃度で調製

抗体溶液：抗テオフィリン抗体の温置緩衝液懸濁液、種々の濃度で調製

化学発光トリガー試薬：100ミリモル・バルビトン緩衝液中5ミリモル・ミクロペルオキシダーゼ（シグマ・ケミカルス）、pH9、0.01%BSA及び0.175モル・H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

【0088】三座共役体の与えられた濃度において得られる最大限化学発光エネルギー転移を最初に評価する。初めに100μlの三座体溶液と100μlの未希釈接近標識溶液を室温で約5～15分間温置する。次にこの混合物のアリコート2個の光電子増倍管の前の460nm（フルオレセインの励起波長）と525nm（フルオレセインの発光波長）の2種のバンド通過フィルターを有する発光光度計にを入れる。次いで適切な量の化学発光トリガー試薬を添加し、存在するイソルミノール分子による発光を誘発する。イソルミノール分子は約460nmで光を放射する。イソルミノールがフルオレセイン標識と密接接近する場合、フルオレセインは525nmでの蛍光エネルギーの共存発光で460nmにおいて放射された光を吸収する。光レベルの525/460nmの比率はエネルギー転移の増加とともに増大する。これらの測定は接近標識溶液の希釈度を高めながら光レベルの比率が減少し始めるまで繰り返す。これにより最大限の信号発生に必要な接近標識溶液の最小限濃度が確定される。接近標識溶液の最小限濃度が設定された後に、最大限の立体障害が生じるのに必要な抗テオフィリン抗体の最適量が決定される。この決定を行うために抗テオフィリン抗体を化学発光トリガーの添加前に温置混合液に添加する。抗テオフィリン抗体の量を増加させながら添加し、抗体溶液の濃度を高めても測定可能なエネルギー転移をさらに低下できなくなるまで順次測定する。これが最大限の立体障害を生じるのに必要な抗体溶液の最小限濃度である。

#### 【0089】被検出体の検定

はじめに100μlアリコートの患者の試験試料を100μlアリコートの最適化抗体溶液と混合する。次にこの混合液を100μlアリコートの三座体溶液及び接近標識溶液を加え、その混合液をさらに5～15分間温置する。この混合液のアリコートを発光光度計に入れ、信号が測定されるまで適量の化学発光トリガー試薬を添加する。次に、同じ操作を種々の希釈度のテオフィリン又はテオフィリン-アミン溶液について繰り返し、それらから標準曲線を得る。標準曲線から試料中のテオフィリン又はテオフィリン-アミンの濃度を内挿することができる。

#### 【0090】例7

三座体メンバーの1つが接近標識であるエネルギー転移  
例6で述べたのと同じ一般操作を三座体メンバーの1つとして接近標識を有する三座体を用いられる場合に用いることができる。例えば、図10Aに示す三座体を使用することができる。この例では接近標識溶液はフルオレセイン-抗DNP抗体のみを含有している。その他の全

てに関しては例6で述べたのと同じ最適化及び検定操作が用いられる。

#### 【0091】例8

三座体メンバーの1つが固体支持体であるエネルギー転移

例6で述べたのと同じ一般操作を三座体メンバーの1つとして複数の接近標識と共役した巨大分子を有する三座体を用いられる場合にもまた用いることができる。巨大分子は図11に示すような固体支持体であってよい。図11に示す三座体を使用する場合も接近標識溶液はフルオレセイン-抗DNP抗体のみを含有している。その他の全てに関しては固体支持体を使用する系の反応速度が遅いことを考慮して温置時間を延長する以外例6で述べたのと同じ最適化及び検定操作が用いられる。

#### 【0092】例9

グリコシル化タンパク質へのビオチン標識の付着結合  
図9に示すボロン酸-アジド-ビオチン三座体がグリコシル化タンパク質の指示位置、すなわち、糖基へビオチン標識を付着結合するのに用いられる。この操作は抗体、酵素又は抗原のビオチニル化に特に有用である。

#### 【0093】ガイドメンバーのターゲット結合

次の試薬を使用する。

グリコシル化タンパク質溶液：抗体溶液、腹水液、抗原溶液及び酵素標本のようなもののグリコシル化タンパク質溶液も用いることができる。これら溶液の多くは市販されている。

緩衝剤溶液：50ミリモル・N-メチルモルホリン塩化物、pH7.2、100ミリモル・塩化マグネシウム  
三座体溶液：図9に示す三座体を10%（w/v）NaOHに溶解し三座体のボロン酸基（ガイドメンバー）の保護解除をする。

グリコシル化タンパク質溶液を緩衝剤溶液中で透析し、脇に置いておく。次に三座体溶液を同じ緩衝剤溶液で希釈する。グリコシル化タンパク質溶液に対し約10～100倍の三座体に相当する希釈三座体溶液のアリコートを取り出し、このアリコートを透析したグリコシル化タンパク質溶液に添加し、全体の混合物を室温、暗所で約2時間温置する。温置に続いて反応混合物を暗所でセファレックス（商標）G-50カラム上でクロマトグラフィー処理すればタンパク質留分を単離することができる。このタンパク質留分はボロン酸複合体（ガイドメンバー結合）を含有する。

#### 【0094】反応性メンバーの付着結合

次に単離生成物をマツダ125W・MB/Vパールガラスランプのような適当な紫外線光源を照射する。照射は0℃で照射器から約5から約20cmの距離のところで行う。アジドからナイトレンへの完全な転化を行わせるため照射は数時間続けられる。三座体のグリコシル化タンパク質への光カップリングはアジド残基のナイトレンへの転化後殆ど直後に生じる。光カップリングに続いて

反応混合物は標準の透析技術を使用して殆どの標準緩衝剤溶液のうちどれか溶液中で透析し、残留する光化学カップリング未了三座体を除去することができる。本発明の範囲内にあると考えられるその他の形式の三座共役体及びそれらの使用方法は当業者には明白であろう。本発明の本質的な精神から離れることなく本発明をいくつかの形式で具体化することができるから、本発明は上記の記載に対照させて別記の特許請求の範囲により明確にされるべきものである。

【0095】

【発明の効果】本発明の三座共役体は、従来の顕色剤抗原とは異なり、長期にわたり貯蔵でき、かつ経費のかかる精製及び特性化操作を必要としない安定で化学的に一定の有機化合物である。また、本発明の三座体は、従来の顕色剤抗原に共役した複数のハプテン部分の競争による複合体化ではなく、三座体のただ1つの部分、すなわち、第2（モジュレート）メンバーの遊離被検出体との競争を利用することによって感度が改善されているため、立体障害を利用した免疫検定に用いるのに好適である。

【0096】本発明の三座体を用いた免疫検定方法は、従来の方法と異なり、タンパク質を変性しかねない過激な反応条件や非特異結合生成を招くことなく、タンパク質の多糖基にターゲットモディフィケーションすることができる。さらに、本発明の三座体を用いた免疫検定方法は、モジュレート三座体メンバーとして抗原フラグメントを有効に使用することができる方法を用いて、ハプテンや薬剤を簡便に検定することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の特定の実施態様を用いるネフェロ分析免疫検定の説明図ある。

【図2】二座共役体I類似体の合成の模式図である。

【図3】二座共役体II類似体の合成の模式図である。

【図4】出発スペーサー基としてピログルタミン酸を用いる三座共役体の一般的な合成の模式図である。

【図5】出発スペーサー基としてS-アセチル-メルカプトコハク酸を用いる三座共役体の一般的な合成の模式図である。

【図6】出発スペーサー基としてカルボベンゾキシリシンを用いるビオチン-テオフィリン-DNP三座共役体の合成の模式図である。

【図7】本発明の立体障害実施態様での使用を目途とするビオチン-テオフィリン-DNP三座共役体の立体配置の説明図である。

【図8】出発スペーサー基としてカルボベンゾキシリシンを用いるフェニルホウ酸-ニトロフェニルアジド-ビオチン三座共役体の合成の模式図である。

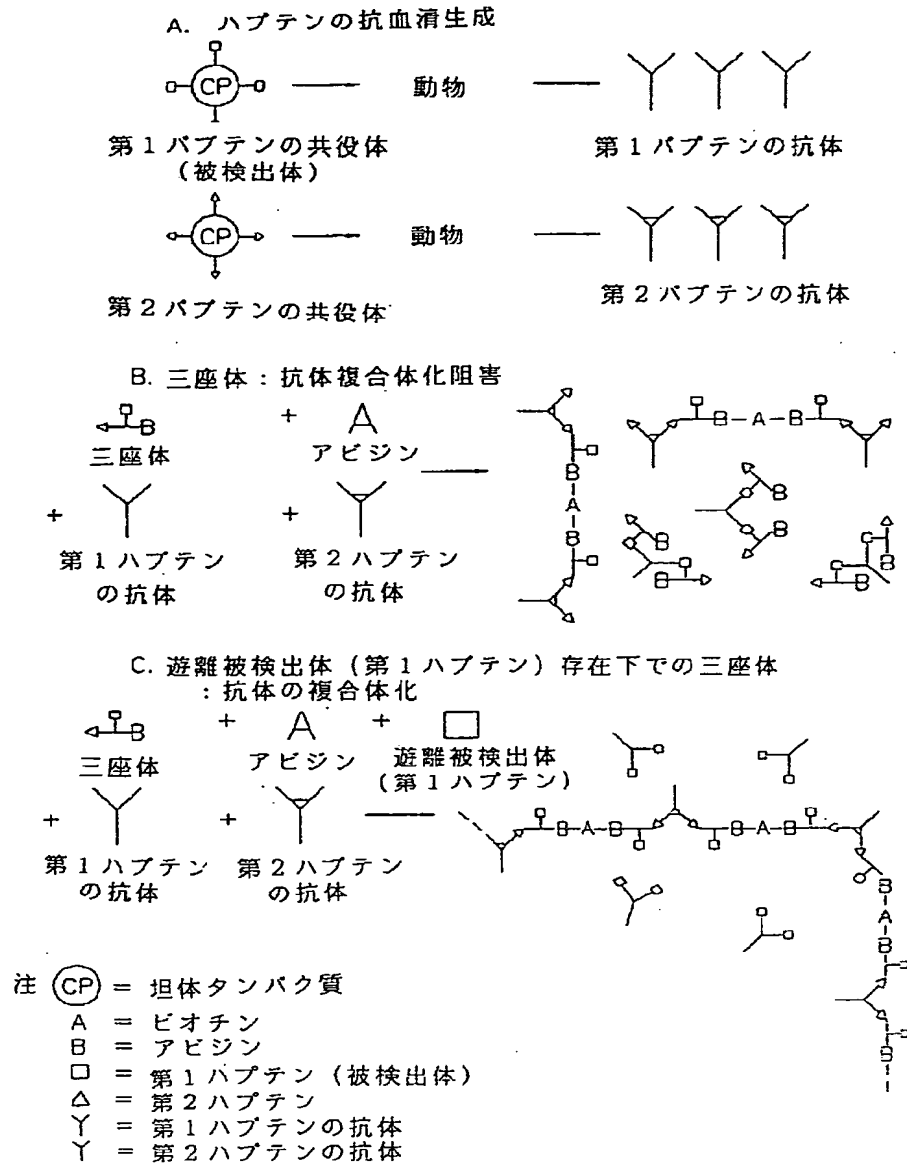
【図9】本発明のターゲット標識実施態様での使用を目途とするフェニルボロン酸-ニトロフェニルアジド-ビオチン三座体の立体配置の説明図である。

【図10】三座体メンバーの1つが接近標識である本発明の立体障害実施態様を用いるエネルギー転移検定での使用を目途とする3種の異なった三座共役体の立体配置の説明図である。

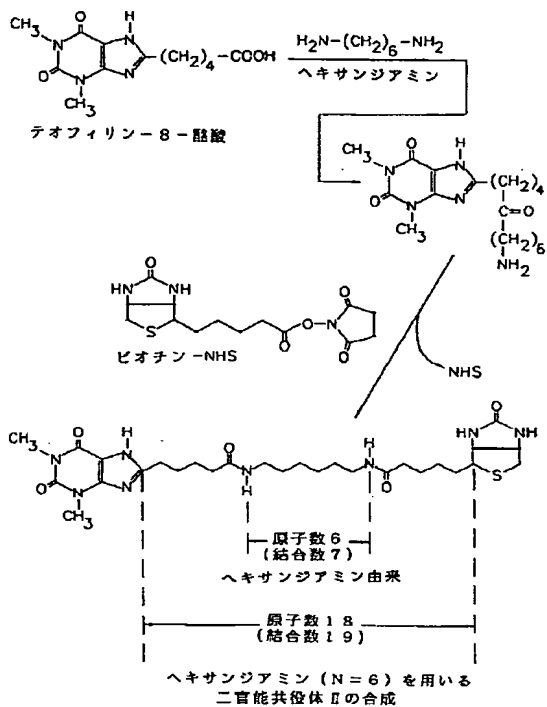
【図11】三座体メンバーの1つが複数の標識と共役した固体支持体である本発明の立体障害実施態様を用いるエネルギー転移検定での使用を目途とする一連の同一三座共役体の模式図である。

【図12】モジュレーションなしの状態ですべての巨大分子特異結合パートナーと同時に結合する三座共役体の第1及び第3メンバーの性能に対するスペーサ長の効果を示すグラフである。

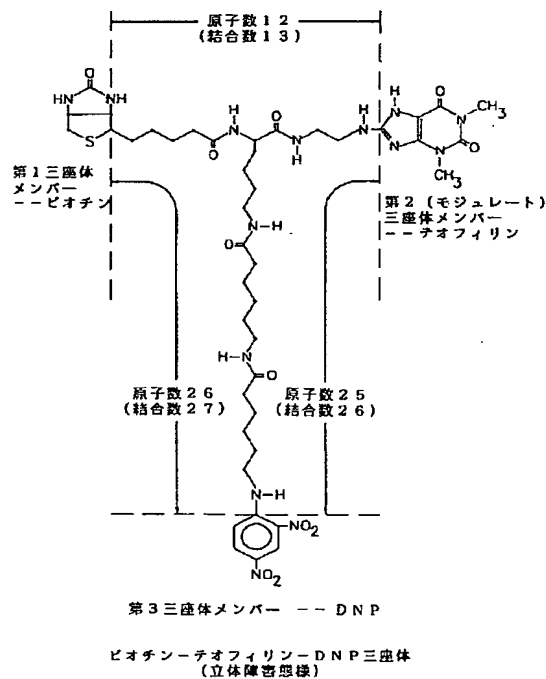
【図1】



【図 3】



【図 7】







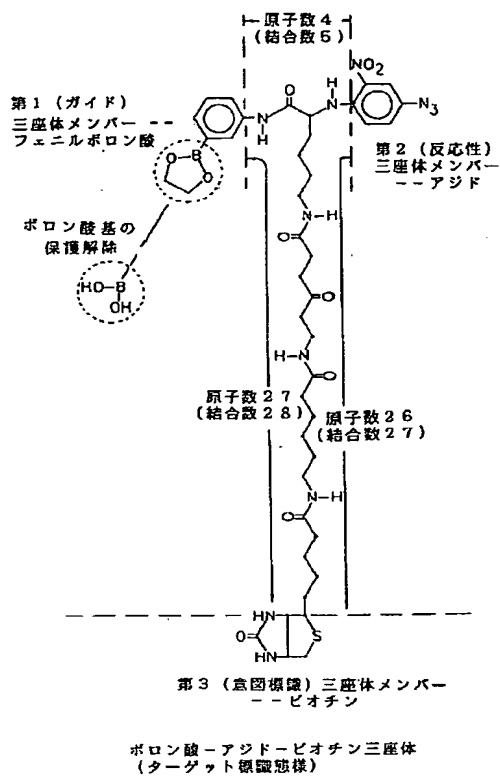
[カルボベンゾキシ(CBZ)]

NHS  
ビオチン-NHS  
(活性化第1メンバー)  
バイオニル-CBZ-リシン  
(第1メンバー-スパーサー)  
H<sub>2</sub>O  
テオフィリン-エチレンジアミン  
(第2メンバー-スパーサー挿入部)  
バイオニル-テオフィリン-  
CBZ-リシン  
(第2メンバー-スパーサー)  
(保護解除)  
DNP-ビス-アミノカプロン酸のNHSエステル  
(活性化第3メンバー-スパーサー挿入部)

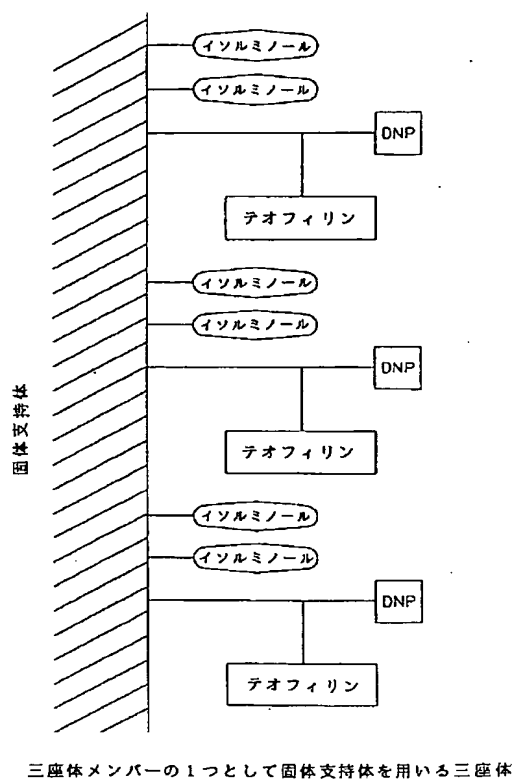
N-テオフィリン-DNP三座体  
(第7図参照)

-34-

【図9】

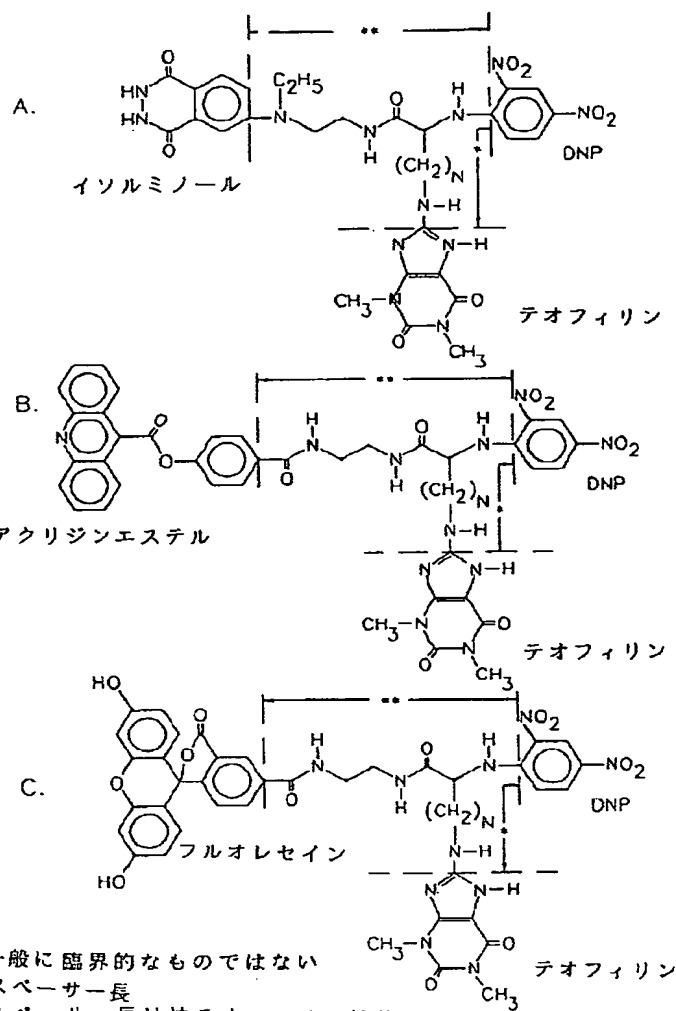


【図11】



【図10】

WO 89/03041



注

\*\*一般に臨界的なものではない  
スペーサー長

\* スペーサー長は抗テオフィリン抗体が標識抗  
DNP抗体の結合を立体障害するのに結合する  
よう十分短い長さでなければならない

三座体メンバーの1つとして  
接近標識を用いる三座体

フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>

G 0 1 N 33/536

識別記号

庁内整理番号

A 8310-2 J

F I

技術表示箇所

(72)発明者 ジェイムズ シー スターンバーグ  
アメリカ合衆国 92635 カリフォルニア  
州 フラートン キャタリーナ ロード  
201